



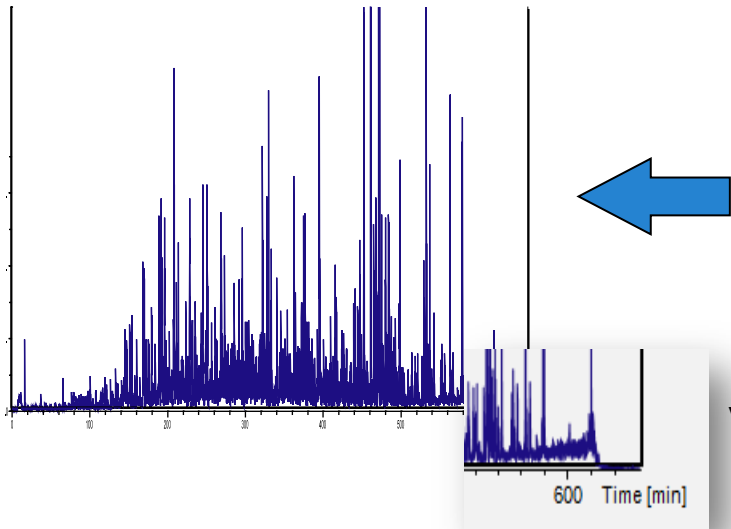
ThermoFisher
S C I E N T I F I C

Von HPLC zu UHPLC (I): Wie schnell kann ich maximal werden, und ist das Schnellste immer das Beste?

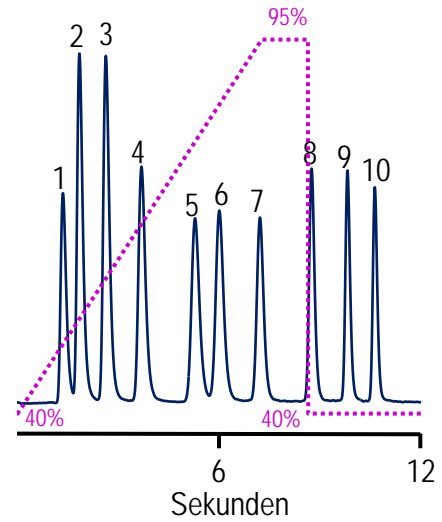
Dr. Markus M. Martin
Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany



Möglichkeiten der UHPLC



Thermo Scientific™
Vanquish™ UHPLC System



Bis zu 1000 Peaks in einem einzigen Lauf

10 Substanzen in 10 Sekunden

Fokus auf Hochempfindlichkeit:
Peakkapazität

Fokus auf Geschwindigkeit:
Probendurchsatz



- „Gute UHPLC-Methoden sind mindestens 10 mal so schnell wie HPLC-Methoden.“
- Kritisch betrachtet:
 - Vom Druckbereich der beiden Techniken her gesehen ist das Geschwindigkeitspotenzial höchstens Faktor 4 größer, alle anderen Beispiele basieren meist auf geringerer Auflösung bei der UHPLC.



Wie hängen Geschwindigkeit, Auflösung und Druck zusammen?

- Aus der van Deemter Theorie zur Bandenverbreiterung folgt:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

- Minimale Bodenhöhe $H \sim dp$ bzw. Bodenzahl $N \sim 1/dp$
- Halb so große Packungsteilchen bringen doppelt so viele Böden (Effizienz)
- Und nebenbei:
 - Analysengeschwindigkeit (= Lineargeschwindigkeit u_{\min}) $\sim 1/dp$
- Beschleunigungspotential:
Auflösung bleibt gleich, wenn $L/dp = \text{konstant}$



Wie hängen Geschwindigkeit, Auflösung und Druck zusammen?

- Aus der van Deemter Theorie zur Bandenverbreiterung folgt:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

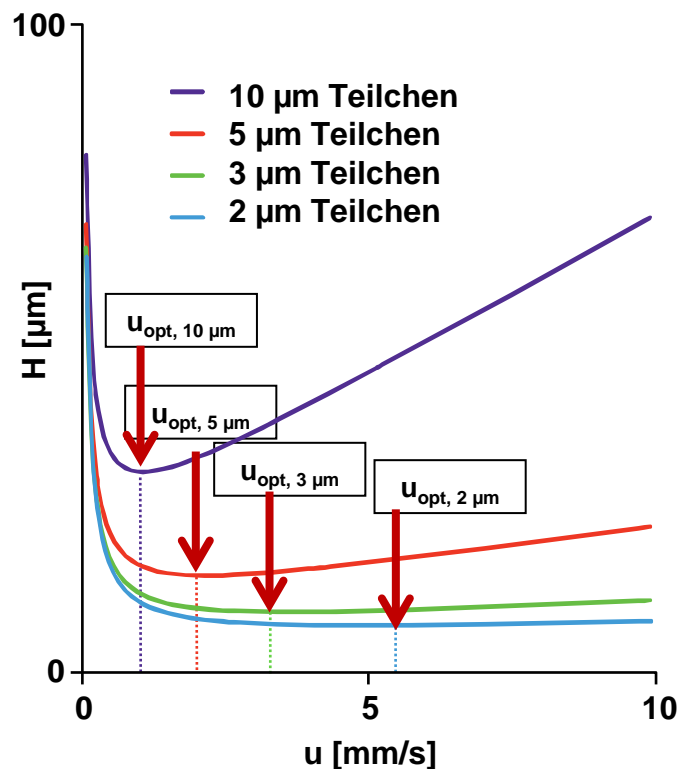
- Minimale Bodenhöhe $H \sim dp$ bzw. Bodenzahl $N \sim 1/dp$
 - Halb so große Packungsteilchen bringen doppelt so viele Böden (Effizienz)
 - Beschleunigungspotential: Auflösung bleibt gleich, wenn $L/dp = \text{konstant}$
- Aus der Purnell-Gleichung folgt:

$$\text{Auflösung } R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2}$$

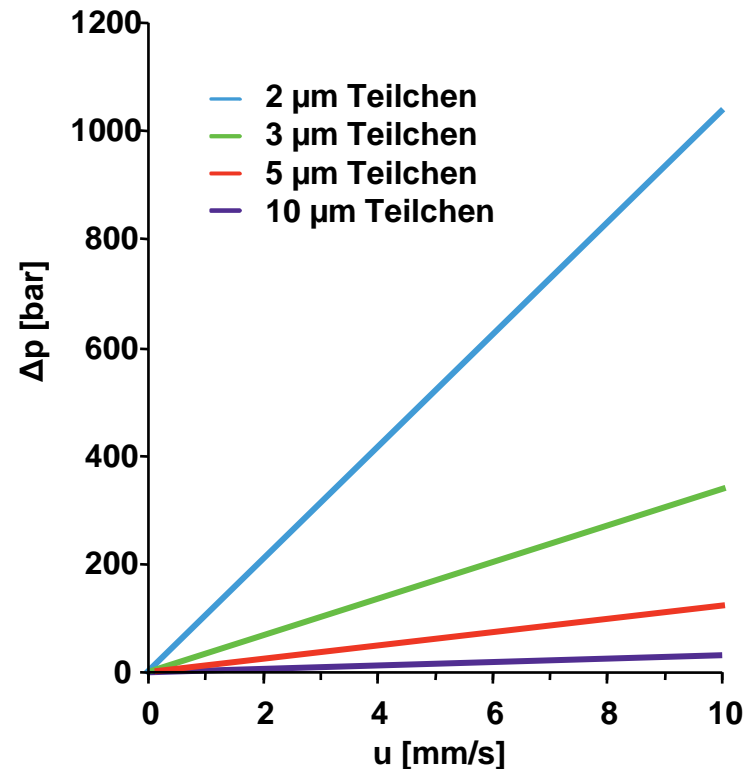
- $R \sim \sqrt{N}$, und damit $R \sim \sqrt{1/dp}$
- Doppelte Auflösung braucht viermal kleinere Packungsteilchen
- ...oder viermal längere Trennsäule bei gleichem Packungsmaterial



a) Trennleistung



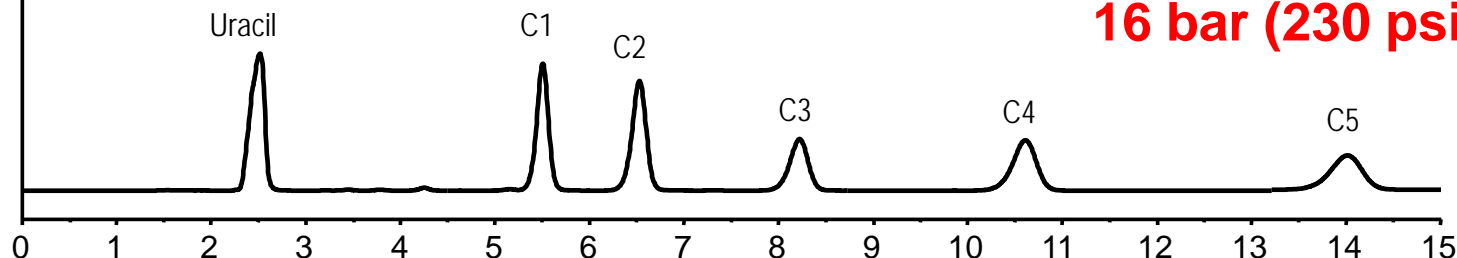
b) Säulenrückdruck



- Der Druck über die Säule steigt umgekehrt zum Quadrat des Teilchendurchmessers: $\Delta p \sim 1/d_p^2$

Verringern der Teilchengröße mit Anpassen der Säulenlänge

250 x 4,6 mm, $dp=10\ \mu\text{m}$, $F=1\ \text{ml/min}$



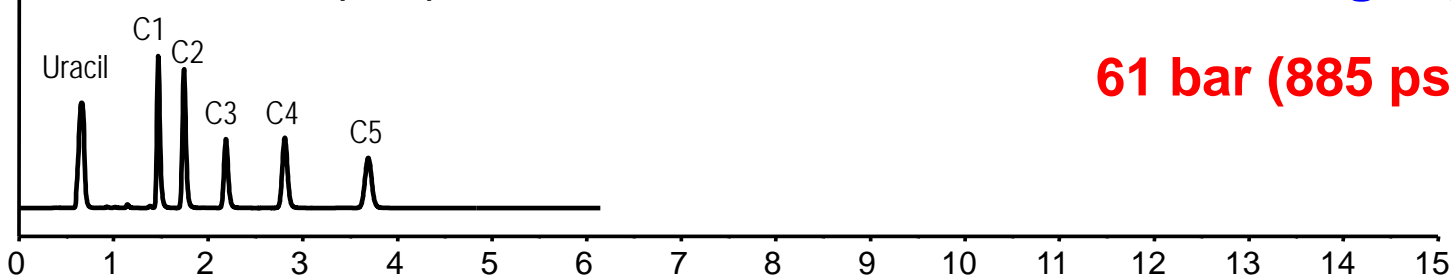
Isokratische Trennung

16 bar (230 psi)

$L/dp = \text{const.}$
 $F \cdot dp = \text{const.}$

125 x 4,6 mm, $dp=5\ \mu\text{m}$, $F=2\ \text{ml/min}$

→ 4-fache Beschleunigung

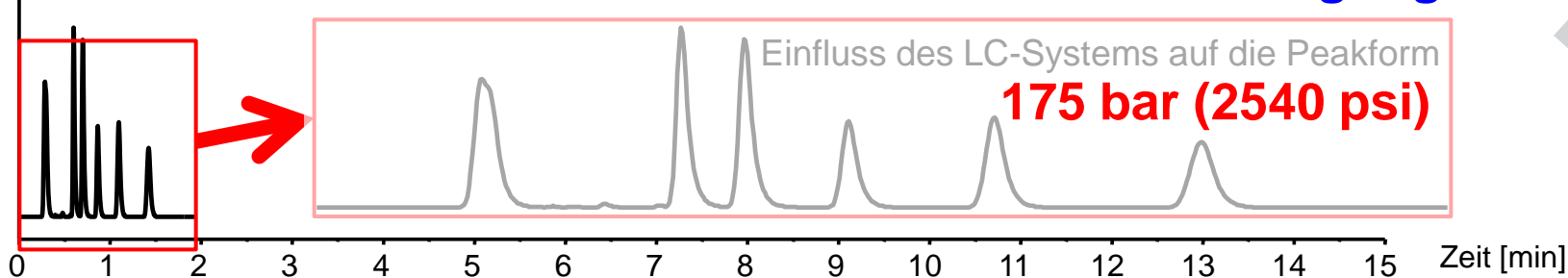


61 bar (885 psi)

$L/dp = \text{const.}$
 $F \cdot dp = \text{const.}$

75 x 4,6 mm, $dp=3\ \mu\text{m}$, $F=3,3\ \text{ml/min}$

→ 11-fache Beschleunigung

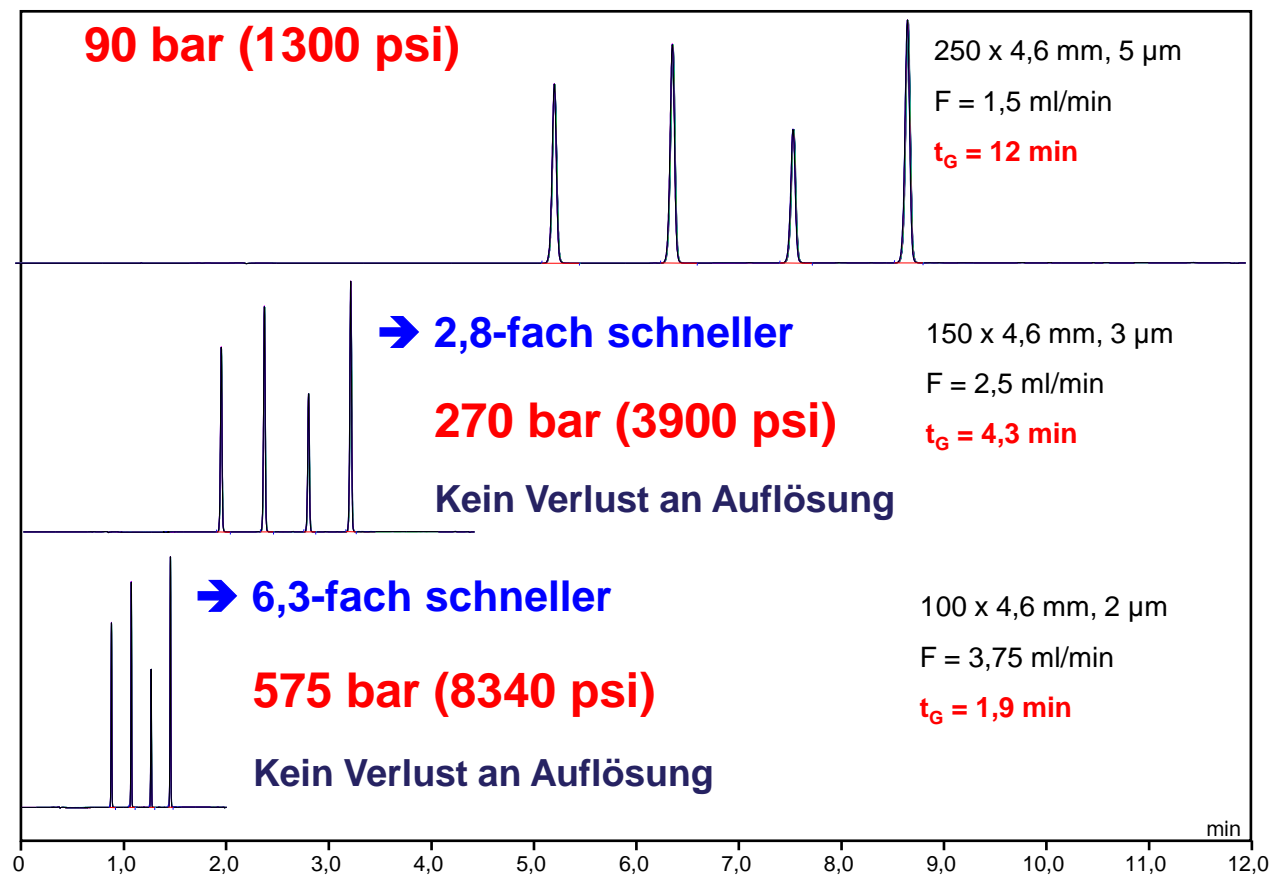


175 bar (2540 psi)

Probe: Phenylalkane C1 – C5, Uracil
Stationäre Phase: ProntoSIL 120 C18 AQ (BISCHOFF Analysetechnik u. -geräte GmbH);
Mobile Phase: 20/80 (v/v) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$; Temperatur: 20 °C

Regeln: $L/dp = \text{const.}$ und $dp \cdot F = \text{const.}$

Funktioniert das auch bei Gradientenmethoden?



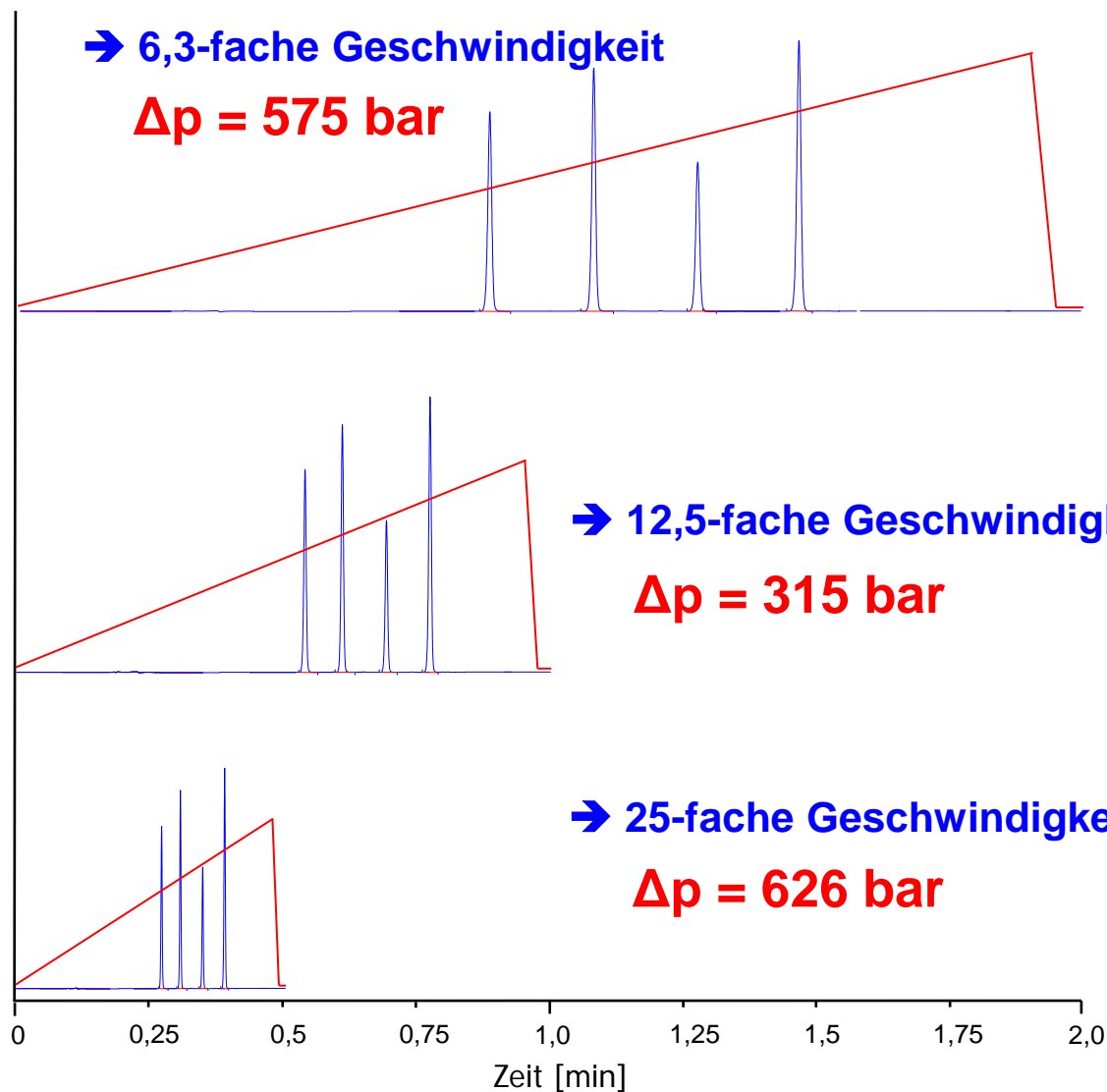
$L/dp = \text{const.}$
 $F \cdot dp = \text{const.}$
 $t_G \cdot F/L = \text{const.}$

$L/dp = \text{const.}$
 $F \cdot dp = \text{const.}$
 $t_G \cdot F/L = \text{const.}$

- Weitere Regel: $t_G \cdot F/L = \text{const.}$
- Wenn alle bisherigen Regeln eingehalten werden, dann...
- ...steigt der Druck linear mit der Analysengeschwindigkeit an
- **Nur: Braucht es immer ein UHPLC-System für Trennungen auf (sub-)2-µm-Teilchen?**



Halbe Säulenlänge – nochmal schneller 😊



100 x 2,1 mm, 2,2 μ m

F = 0,75 ml/min

$t_G = 1,9$ min

$V_{inj} = 2$ μ l

50 x 2,1 mm, 2,2 μ m

F = 0,75 ml/min

$t_G = 0,95$ min

$V_{inj} = 1$ μ l

50 x 2,1 mm, 2,2 μ m

F = 1,50 ml/min

$t_G = 0,48$ min

$V_{inj} = 1$ μ l



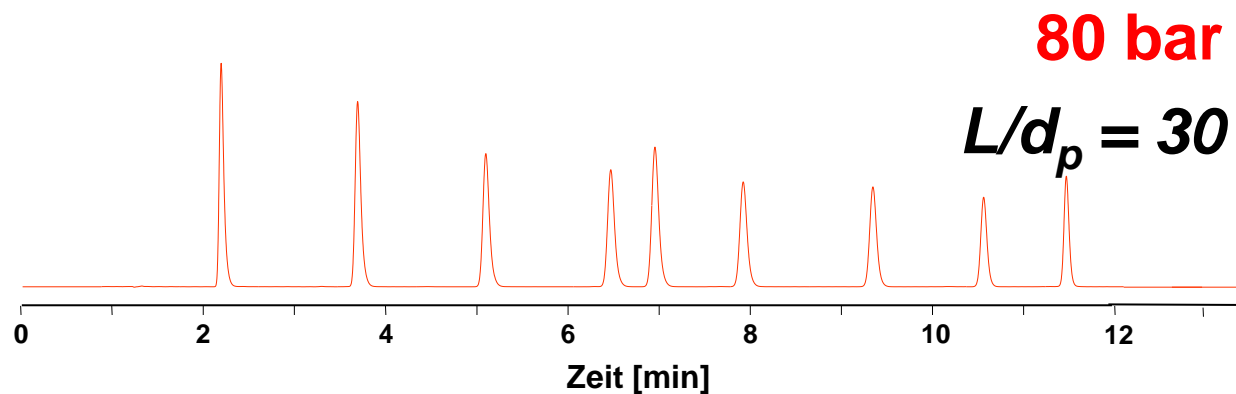
Können wir gar eine *60-fache* Beschleunigung erzielen?

150 x 4,6 mm, 5 μm

F = 1,5 ml/min

$t_G = 12$ min

T = 30 °C

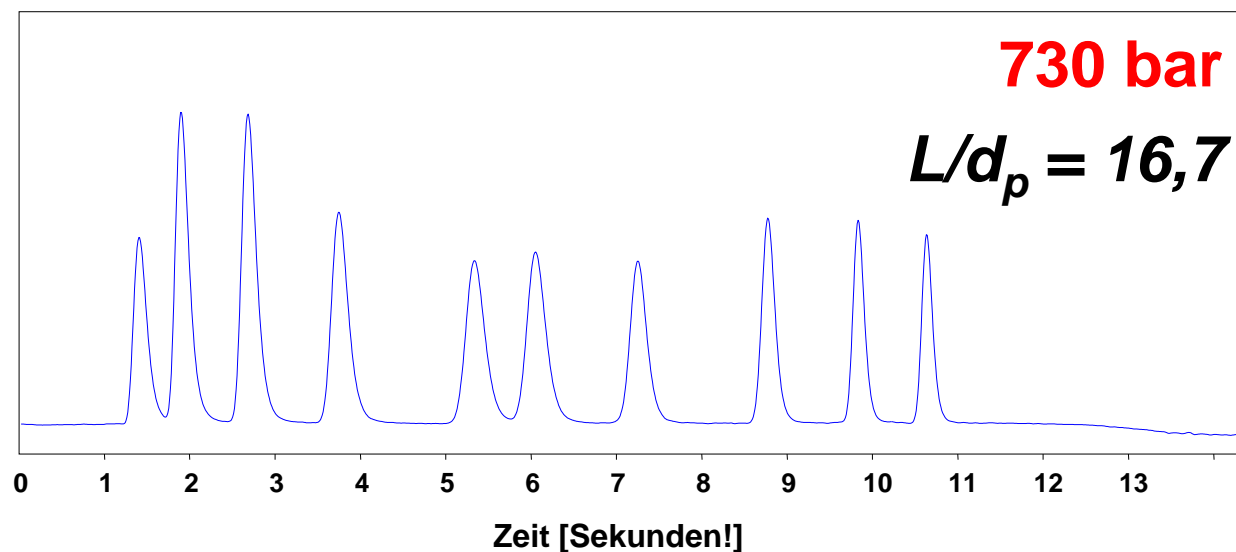


30 x 2,1 mm, 1,8 μm

F = 3,7 ml/min

$t_G = 12$ s

T = 100 °C



- Nur 9-facher Druck, aber 60-mal so schnell – wo ist der Haken?
- L/d_p nicht konstant / kleinere Auflösung – Abstriche bei der Qualität



Fazit 1: Konzept zur Geschwindigkeitsoptimierung

- Analysengeschwindigkeit:
 - $t_{\text{Analyse}} \sim 1/p$ (bei konstanter Auflösung R)
- Ein 1000-bar-UHPLC-System liefert damit 'nur' 2,5-mal soviel Analysengeschwindigkeit wie ein 400-bar-HPLC-System.



Fazit 1: Konzept zur Geschwindigkeitsoptimierung

Verwende kleine Packungsteilchen in kurzen Säulen



Führt zu gleicher Trenneffizienz bei verkürzter Trenndauer



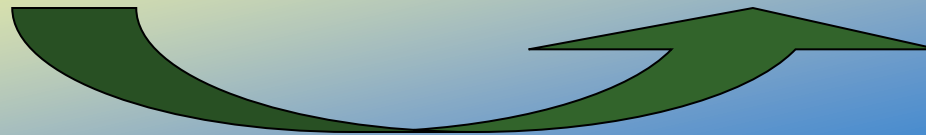
Erlaubt schnellere Trennung bei geringerer Peakverbreiterung

Kürzere Analysenzeit

Weniger Eluentenverbrauch

Geringerer Probenbedarf

Gleiches Ergebnis

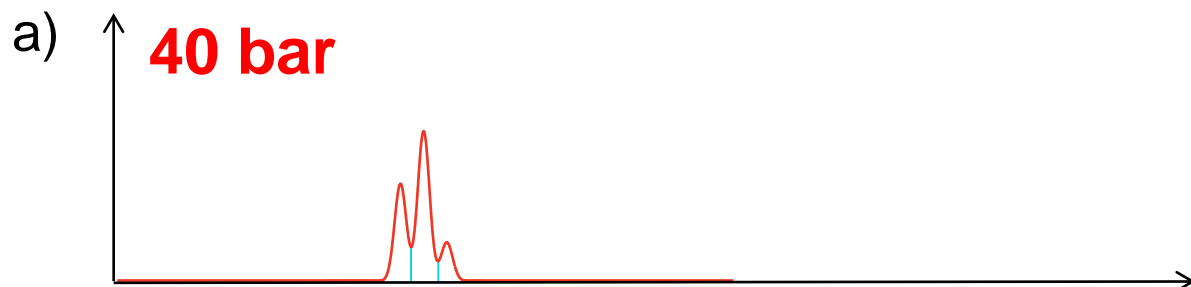




- Erreicht man mit einer Verkleinerung des Teilchendurchmessers immer bessere Peakauflösung?
- Kritisch betrachtet:
 - Das ist grundsätzlich richtig, aber es setzt auch einen entsprechenden Erhalt der Säulenlänge und meist eine Anpassung der Lineargeschwindigkeit voraus. In jedem Fall ist eine immense Erhöhung des Druckes damit verbunden.



Welche Optimierungskonzepte habe ich zur Auswahl?



100 x 4,6 mm, 5 μ m

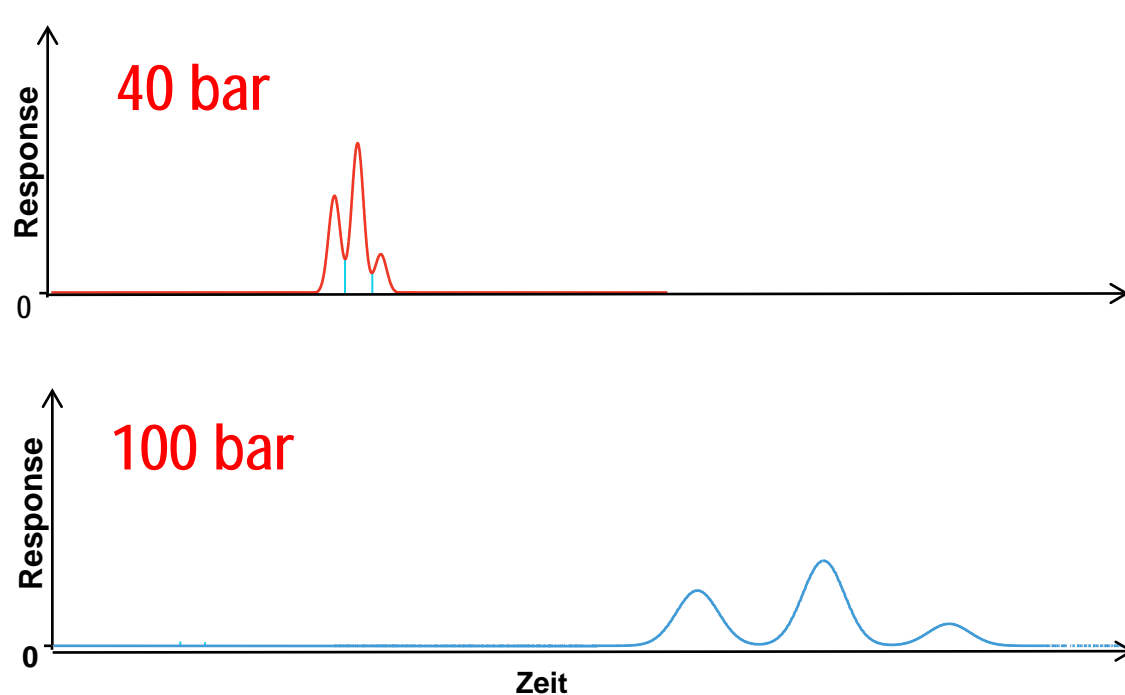
F = 1,5 ml/min

Rs = 0,94

L/dp = 20

- b) Mehr Böden bei gleichem Phasenmaterial \rightarrow Verlängern der Säule
- c) Mehr Böden bei gleichen Säulendimensionen \rightarrow kleinere Teilchen
- d) Eine Kombination aus beiden Ansätzen?

b) Mehr Böden bei gleichem Phasenmaterial durch längere Trennsäule



100 x 4,6 mm, 5 μ m

F = 1,5 ml/min

R_s = 0,9

L/dp = 20

250 x 4,6 mm, 5 μ m

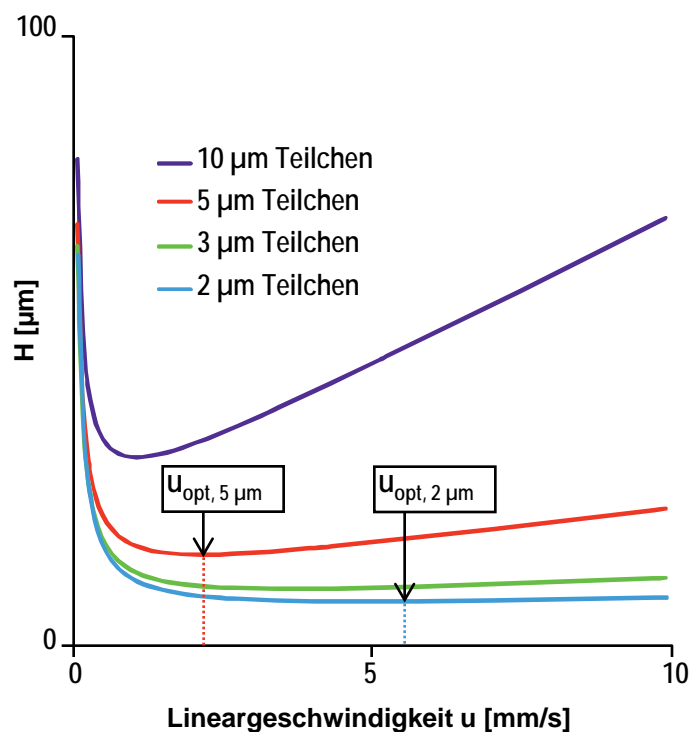
F = 1,50 ml/min

R_s = 1,5

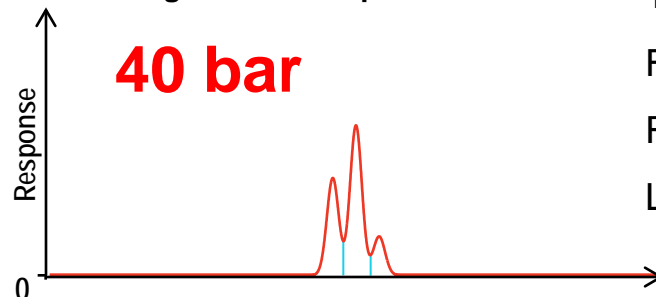
L/dp = 50

- Führt zu 1,6x höherer Auflösung bei 2,5x höherem Druck
– und 2,5x längerer Analysenzeit
- **Hilfreich, wenn die Analysendauer zweitrangig ist (und das Chromatogramm keinen Schönheitspreis gewinnen soll)**

c) Mehr Böden bei gleichen Säulendimensionen durch kleinere Teilchen



Trennung auf einem 5- μm -Material



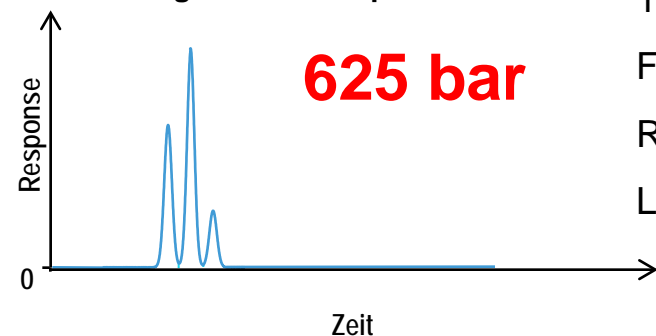
100 x 4,6 mm, 5 μm

$F = 1,50 \text{ ml/min}$

$R_s = 0,9$

$L/dp = 20$

Trennung auf einem 2- μm -Material



100 x 4,6 mm, 2 μm

$F = 3,75 \text{ ml/min}$

$R_s = 1,5$

$L/dp = 50$

- 16-facher Druck für die 1,6-fache Auflösung – ist es das wert?
- Die Geschwindigkeit steigt auf das 2,5-fache – aber ist das denn gefordert?



Bessere Auflösung bei *gleicher* Geschwindigkeit

d) Steige auf ein L und dp um, welche ungefähr dieselbe Analysengeschwindigkeit erlauben:



100 x 4,6 mm, 5 μ m

F = 1,5 ml/min

$R_s = 0,9$

L/dp = 20



150 x 4,6 mm, 3 μ m

F = 2,5 ml/min

$R_s = 1,5$

L/dp = 50

- 1,6x höhere Auflösung bei 6,9-fachem Druck - und 1,1-fachem Zeitaufwand

Die Lösungsansätze im Überblick

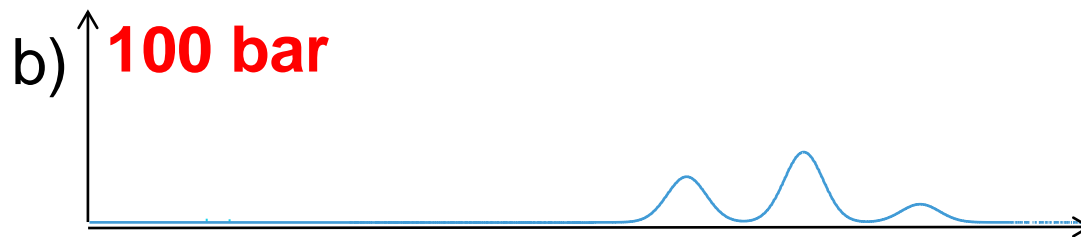


100 x 4,6 mm, 5 μ m

F = 1,5 ml/min

Rs = 0,94

L/dp = 20

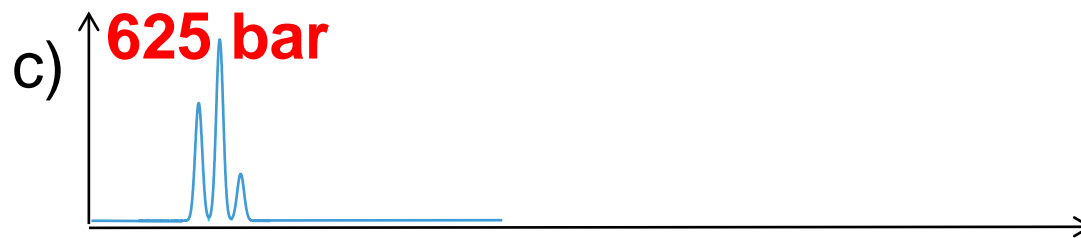


250 x 4,6 mm, 5 μ m

F = 1,50 ml/min

Rs = 1,5

L/dp = 50

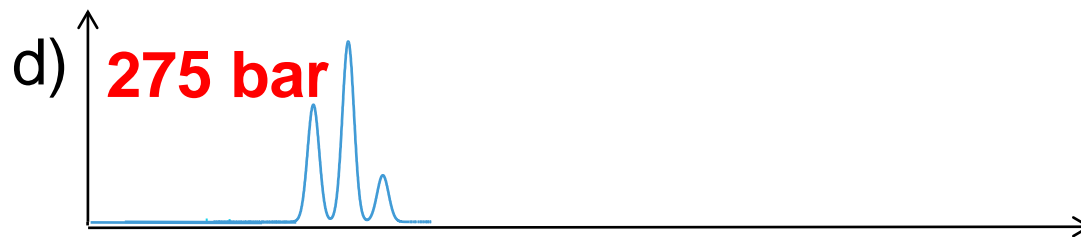


100 x 4,6 mm, 2 μ m

F = 3,75 ml/min

Rs = 1,5

L/dp = 50



150 x 4,6 mm, 3 μ m

F = 2,5 ml/min

Rs = 1,5

L/dp = 50



...oder systematisch richtig machen, um die beste Ausnutzung des Druckbereichs zu gewährleisten:

- Peakauflösung
 - $R \sim p^4$ (bei konstanter Analysenzeit)
- Bessere Auflösung durch längere Säulen gleichen Phasenmaterials:
 - Kostet Analysenzeit
- Bessere Auflösung durch kleinere Teilchen in gleicher Säulenhardware (und angepasster Flussrate):
 - Beschleunigt die Trennung, bei **erheblich** mehr Druck
- Bessere Auflösung durch moderate Anpassung von Säulenlänge und Teilchengröße → **beste Variante**:
 - Erhält die Analysengeschwindigkeit bei moderatem Druckanstieg

- Wird bei einer Gradientenmethode auf eine kürzere Säule gewechselt, muss stets die Steigung des Gradienten um den gleichen Faktor wie die Verkürzung der Säule erhöht werden, um ein gutes Ergebnis zu erhalten.

Gelten die Beschleunigungsregeln auch für Gradiententrennungen?

- Das Gradientenvolumen-Konzept (GVK):

Gradientenvolumen V_G :	F	:	Flussrate [ml/min]
	t_G	:	Dauer des Gradientensegments
	V_C	:	Säulenvolumen
	L	:	Säulenlänge
	d_c	:	Säulendurchmesser

$$V_G = F \cdot t_G$$

- Halte V_G konstant, wenn die Flussrate zur Beschleunigung der Gradiententrennung erhöht werden soll
- Halte das Verhältnis V_G/V_C konstant, um Gradiententrennungen auf Säulen anderer Abmessungen zu übertragen

$$\frac{F \cdot t_G}{V_C} \equiv \text{const.} \quad t_{G,new} = t_{G,old} \cdot \frac{F_{old}}{F_{new}} \cdot \frac{L_{new} \cdot d_{c,new}^2}{L_{old} \cdot d_{c,old}^2}$$

- Dann eluieren Peaks stets bei gleicher Eluentenzusammensetzung
- Chromatographische Trennung ändert sich nur bezüglich der Trenndauer

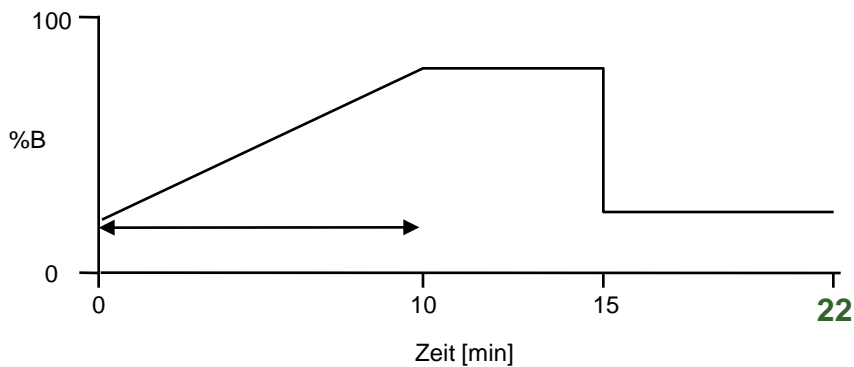


Wie übertrage ich in der Praxis ein Gradientenprogramm?

**4,6 x 250 mm Säule, 5 µm
1,5 ml/min ($u = 2,2$ mm/s)**



Säulenvolumen (V_C) = 4,15 ml



Erster Schritt des Originalgradienten 0-10 min

$$t_G = 10 \text{ min}$$

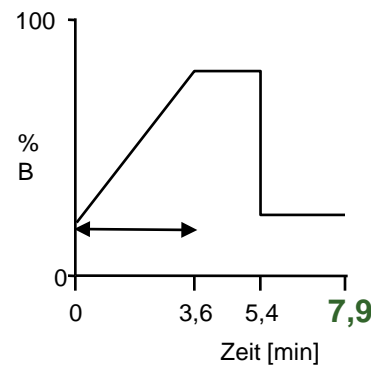
$$F = 1,5 \text{ ml/min}$$

$$V_C = 4,15 \text{ ml}$$

**2,1 x 150 mm Säule, 3 µm
0,52 ml/min (erhöhe $u = 3,7$ mm/s)**



Säulenvolumen (V_C) = 0,52 ml



Neuer erster Gradientenschritt 0-3,6 min

$$t_{G,new} = t_{G,old} \cdot \frac{F_{old}}{F_{new}} \cdot \frac{V_{C,new}}{V_{C,old}} \quad t_{G,new} = 10 \cdot \frac{1,5}{0,52} \cdot \frac{0,52}{4,15} = 3,6 \text{ min}$$

HPLC Method Development Calculator: <http://www.separatedbyexperience.com/products/GradientMethod.aspx>



Regeln zum Verhältnis Gradientenvolumen/Säulenleervolumen

$$V_G = 5 V_M$$

- Empfohlen zur Spurenanalytik bekannter Analyten
- Kleine Gradientenvolumina ergeben schmale Peakvolumina
- führt zu begrenzter Peakverdünnung und besseren Nachweisgrenzen (LOD)

$$V_G = 10 - 15 V_M$$

- Für optimale Auflösung bei durchschnittlicher Laufzeit
- empfehlenswert, wenn nicht genügend Selektivität vorliegt

$$V_G > 15 V_M$$

- Für die komplexe Multikomponentenanalyse
- empfohlen für höchstmögliche Peakkapazität

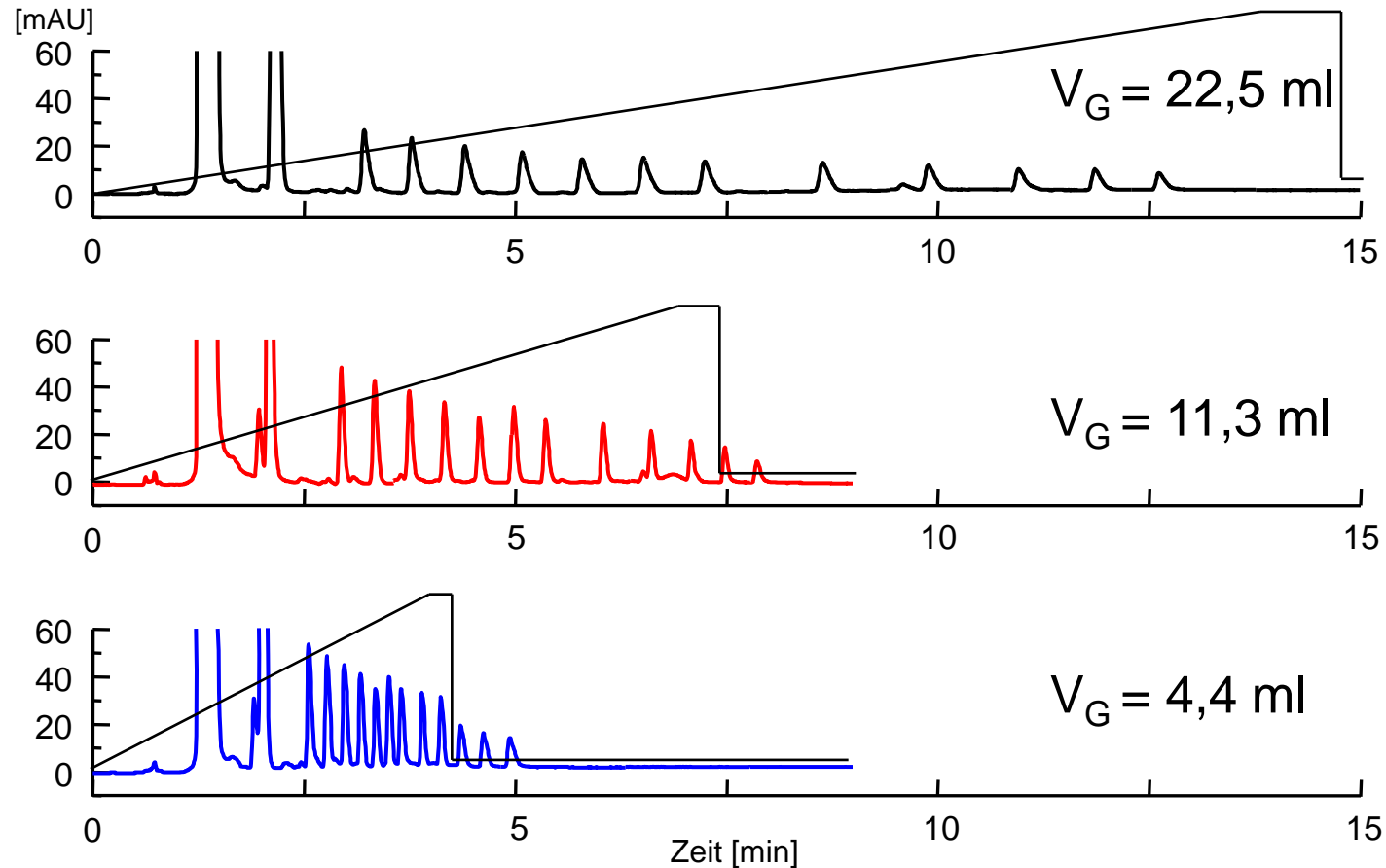
$$V_M = \varepsilon_t \cdot r^2 \cdot \pi \cdot L$$

L : Säulenlänge [mm]

r : Säulenradius [mm]

ε_t : totale Porosität (ca. 0,7)

Erhöhe die Gradientensteigung – verringere das Gradientenvolumen



- Mit geringerem Gradientenvolumen...
- ...nimmt die Peakhöhe zu
- ...nimmt die Selektivität/relative Retention ab
- ...können sich Elutionsreihenfolgen durch Selektivitätsänderungen umkehren

- Wird das Gradientenvolumen einer Gradiententrennung im Verhältnis zum Säulenleervolumen konstant gehalten,
 - Dann eluieren Peaks stets bei gleicher Eluentenzusammensetzung
 - Und ein konstantes Gradientenvolumen erlaubt eine Beschleunigung der Gradiententrennung über eine erhöhte Flussrate, ohne dass sich die relative Retention der Substanzen signifikant ändert.

- Wird das Gradientenvolumen nicht proportional zum Säulenvolumen verringert, sondern bleibt relativ zu groß,
 - Dann ergibt sich fast kein Zeitgewinn
 - Dann können sich relative Retentionszeiten verändern
 - Dann steigt normalerweise die Auflösung, aber die Peakhöhen (S/N) nehmen ab

- Die Analysengeschwindigkeit steigt linear mit dem Rückdruck an.
- Um bei einer gegebenen Methode mit bekanntem Säulenmaterial die Auflösung über bessere Effizienz zu *verdoppeln*, braucht man

ENTWEDER

- Packungsteilchen mit einem Durchmesser von *einem Viertel* des Ausgangsmaterials,
- was zum *16-fachen* Rückdruck
- bei gleicher Analysendauer führt

ODER

- eine *viermal* so lange Säule bei gleichem Teilchendurchmesser,
- was nur einen *vierfach* höheren Rückdruck provoziert,
- aber dafür zugleich die Analysendauer ebenfalls *vervierfacht*.
- *Der Preis für Zeit UND Qualität ist Rückdruck*
 - *Weniger ist hier manchmal mehr, je nach Aufgabenstellung*
- *UHPLC gibt einem größere Freiheit, Chromatographie auszureizen*

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit und Ihr Interesse!

Bei weiteren Fragen oder Kommentaren zu diesem Webinar
wenden Sie sich bitte an
analyze.eu@thermofisher.com