



Von HPLC zu UHPLC: Was sind die apparativen Anforderungen und Fallstricke?

Dr. Alexandra Manka
Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany

Konzept zur Geschwindigkeitsoptimierung in der UHPLC

Verwende kleine Packungsteilchen in kurzen Säulen



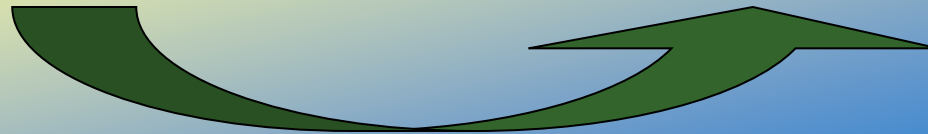
Führt zu gleicher Trenneffizienz bei verkürzter Trenndauer



Erlaubt schnellere Trennung bei geringerer Peakverbreiterung

Kürzere Analysenzeit
Weniger Eluentenverbrauch
Geringerer Probenbedarf

Gleiches Ergebnis



UHPLC-Systeme: Was muss ich beachten?

Detektor:

- Flusszellen
- Datenrate (DCR)
- Filterkonstante



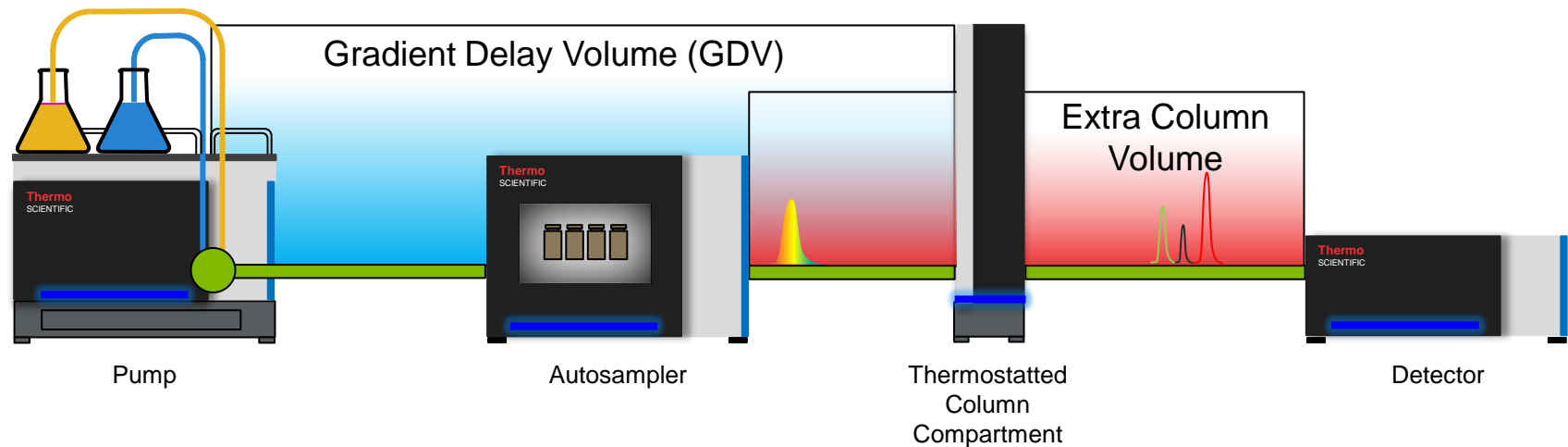
Kapillaren:

- Extrasäulenvolumen (ECV)
- Durchmesser

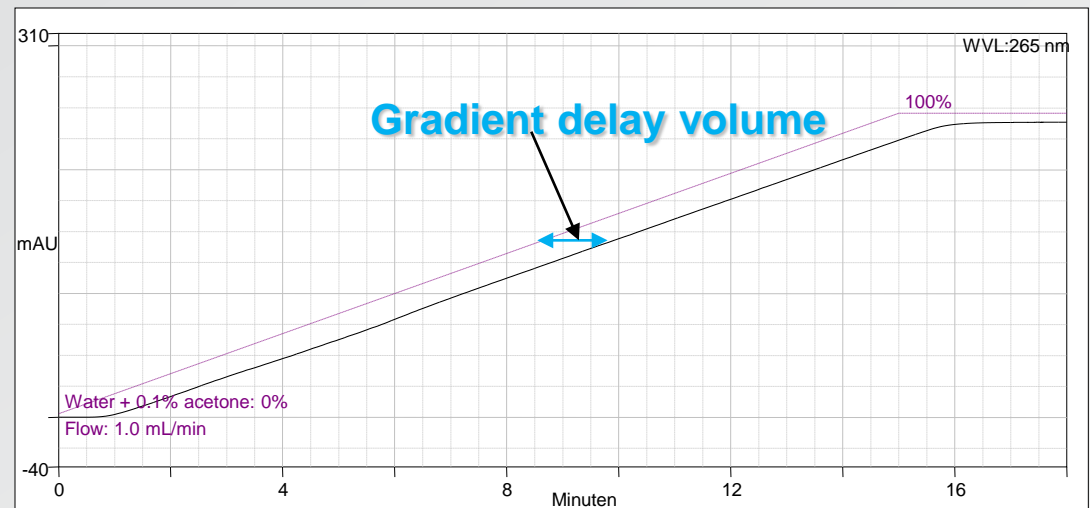
Pumpe:

- Druckbereich
- Gradientenverzögerungsvolumen (GDV)

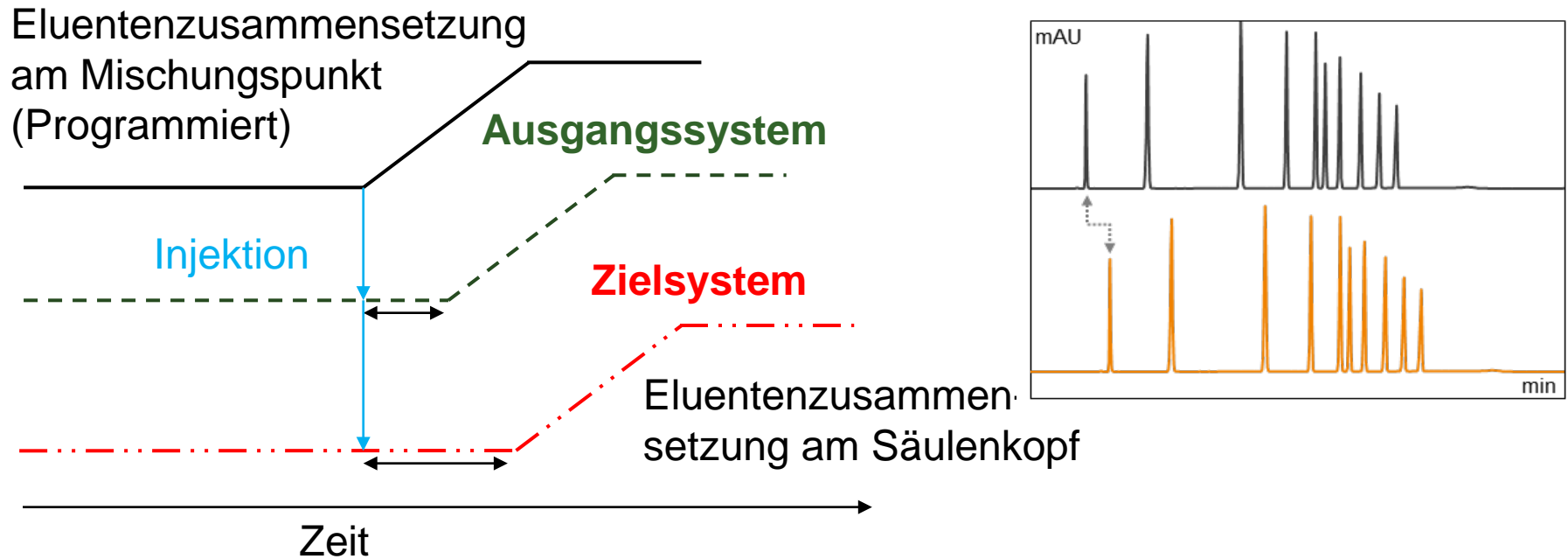
Gradientenverzögerungsvolumen und Extrasäulenvolumen



- **Gradient Delay Volume (GDV):**
Fluidisches Volumen vom Punkt der Mischung des Gradienten bis zum Säulenkopf
- **Extra Column Volume (ECV):**
Fluidisches Volumen von der Injektion der Probe bis zur Mitte der Detektorflusszelle

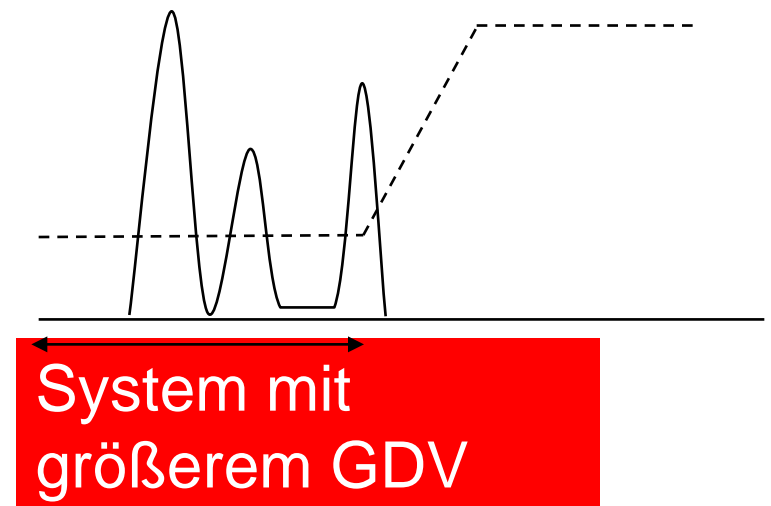
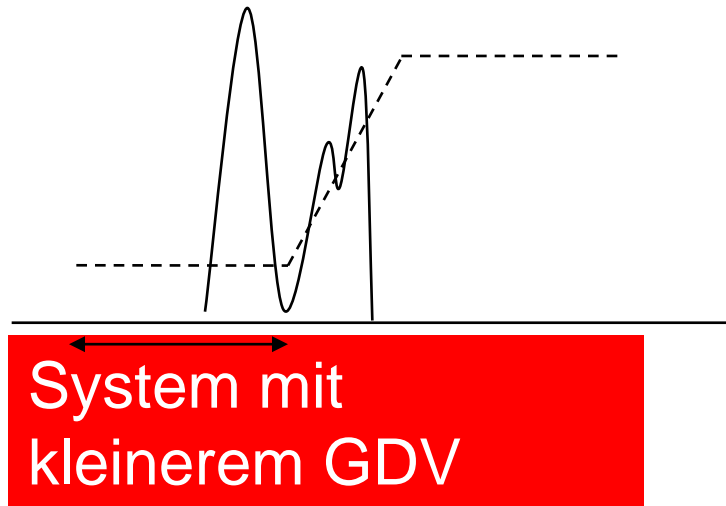
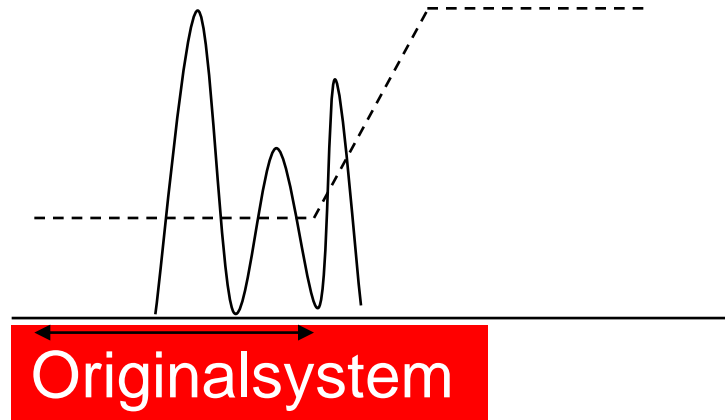


Wie beeinflusst das GDV meinen Methodentransfer?

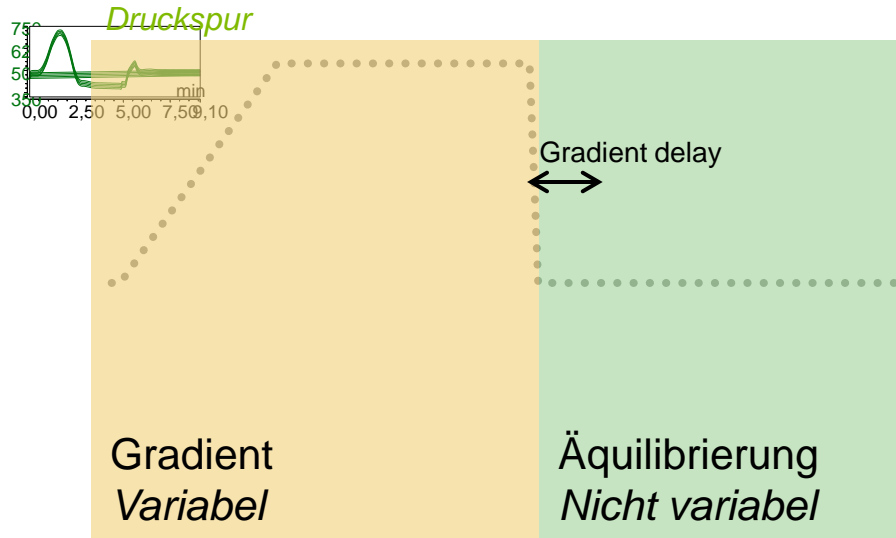


- Vergleiche die GDVs
- Wenn das Zielsystem ein kleineres GDV aufweist:
→ füge einen Halteschritt vor dem Gradientenprogrammstart hinzu
- Wenn das Zielsystem ein größeres GDV aufweist:
→ Minimiere das isokratische Segment (z.B. mit Microflow Kits, kleinerem Tubing ID, Autosampler Bypass)

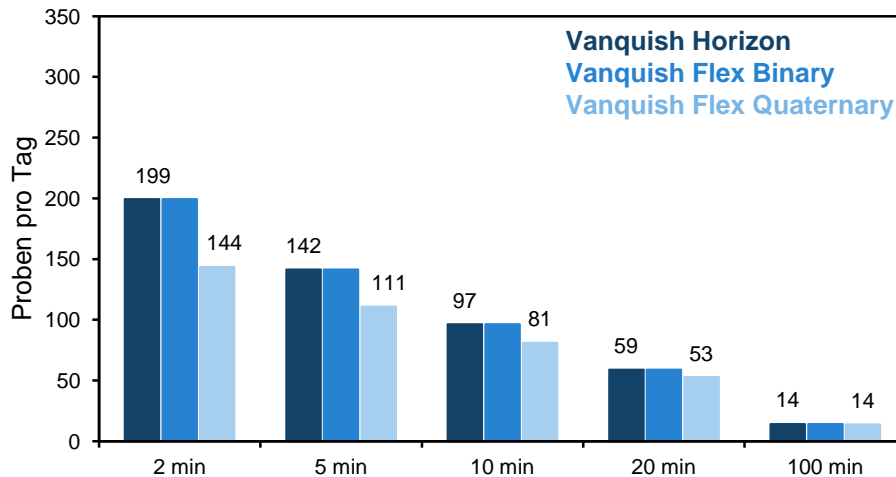
Verschiedene GDVs und ihr Einfluss auf früh eluierende Peaks



Der Einfluss des GDVs auf den Durchsatz



Anteil der Äquilibrierung nimmt bei kürzeren Läufen zu



Kürzere Methoden und höherer Durchsatz

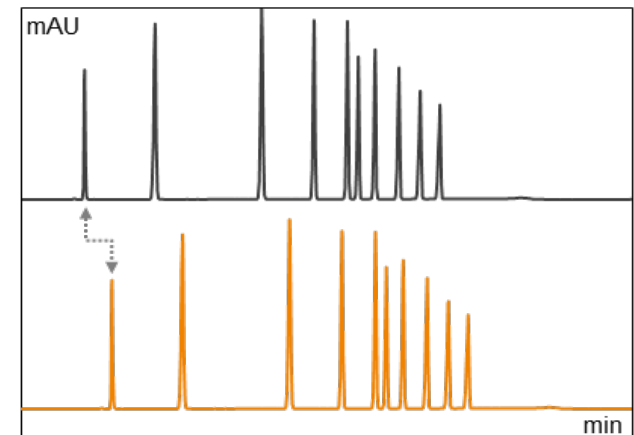
- Die Dauer der Säulen-äquibrierung hängt vom GDV ab
- Je kleiner das GDV, desto kürzer die Äquibrierung
- Beitrag der Säulenäquibrierung zur Gesamtdauer steigt bei kürzeren Methoden

→ **Maximierung des Durchsatzes: Binäre Pumpen mit kleineren GDV**

→ **Bei längeren Läufen wird das GDV vernachlässigbar**

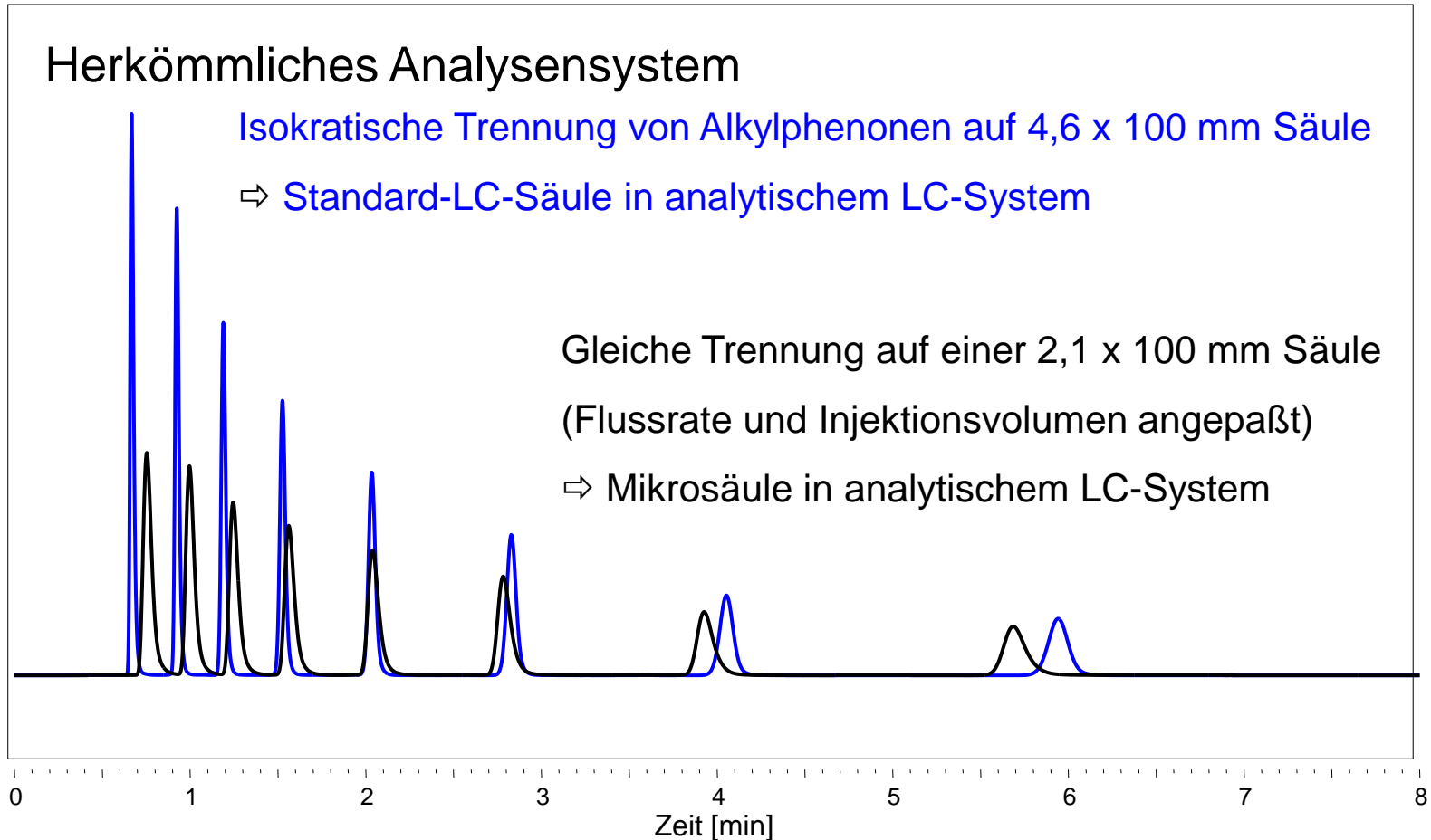
Einflüsse des Gradientenverzögerungsvolumen (GDV)

- GDV beeinflusst bzw. erzeugt
 - eine isokratische Stufe zu Beginn jeder Gradiententrennung
 - Schärfe des Gradienten
 - Nötige Äquilibrierungszeit der Säule und damit die Gesamtanalysendauer
 - Schwach retardierte Substanzen sind meist mehr vom GDV-Einfluss betroffen als spät eluierende
- ⇒ **Besondere Berücksichtigung bei steilen Gradienten und niedrigen Flussraten**



Einfluss des Außersäulenvolumens auf Effizienz und Auflösung

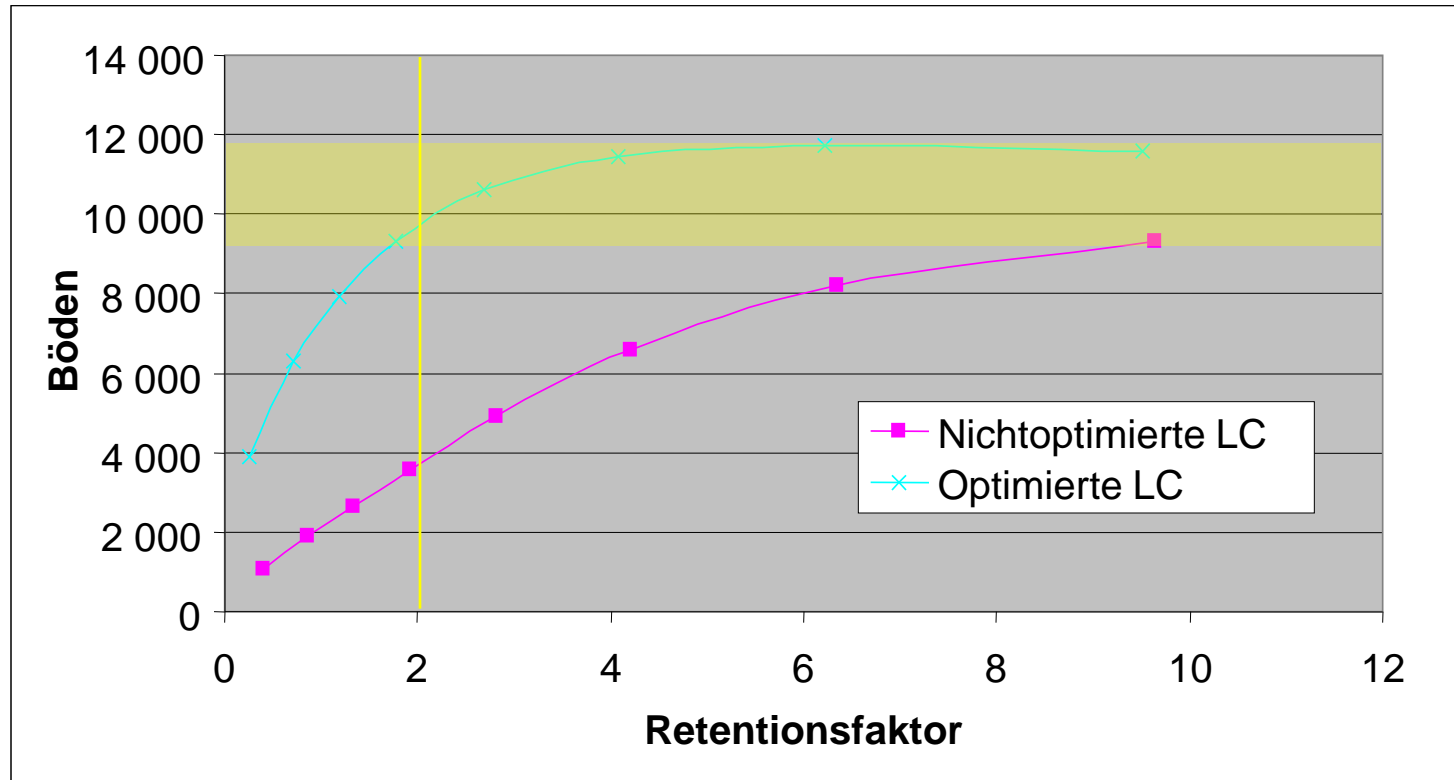
Außersäulenvolumen – Extra Column Volume (ECV)



Gravierende Peakverbreiterung außerhalb der Säule beeinträchtigt Auflösung und Detektionsempfindlichkeit

Einfluss des ECV auf die gemessene chromatographische Effizienz

- Charakterisierung der Effizienz eines ECV-optimierten LC-Systems mit einer Säule von 2,1 mm ID

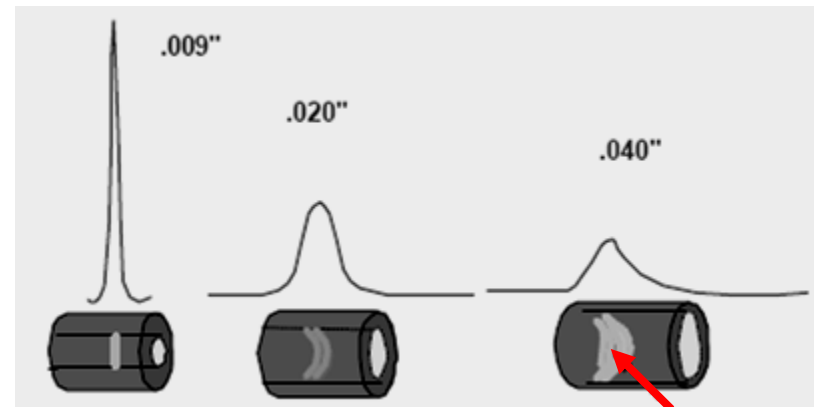
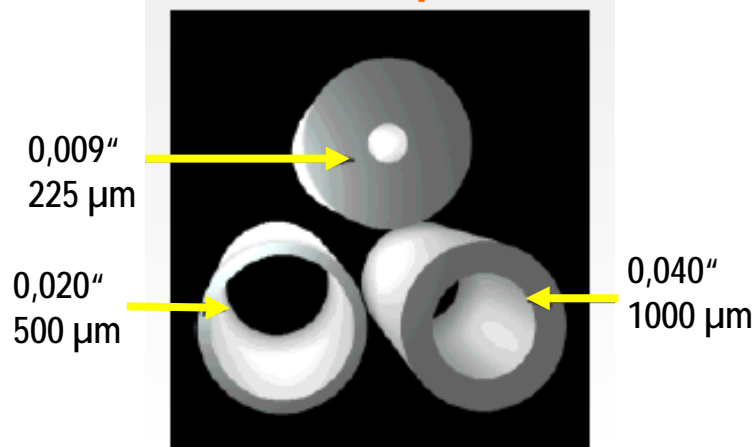


- Die Effizienz bei $k=2$ sollte $\geq 80\%$ der typischen Säuleneffizienz (Bodenzahl) betragen!

Effizienzverlust dank falsch dimensionierter Kapillarabmessung

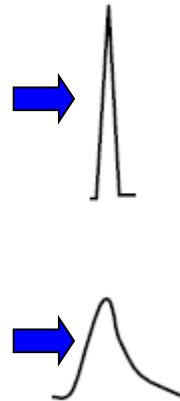
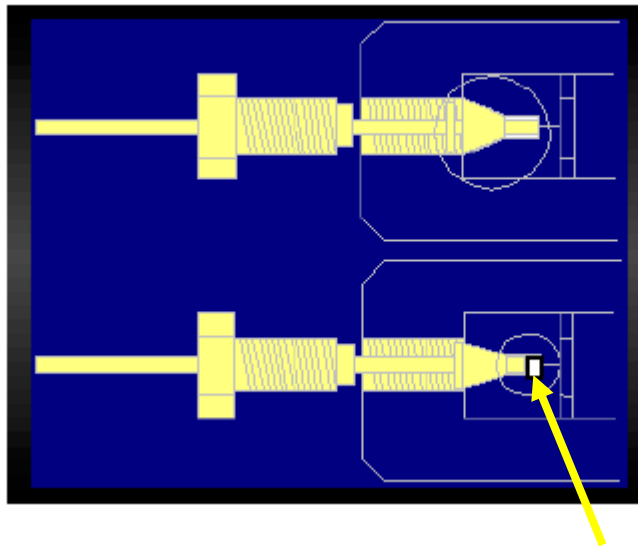
- Das Kapillarovolumen muss verringert werden, wenn...
 - ...das Volumen der Trennsäule verkleinert wird (betrifft Länge und/oder I.D.!)
 - ...die Effizienz der Trennsäule erhöht wird
- Der *Innendurchmesser* hat deutlich größeren Einfluss als die *Kapillarlänge*

1/16" OD Kapillaren



Verzerrte Probenzone

- ...ein oft vernachlässigtes Thema!



Fingerring

Totvolumen, falls die Kapillare beim Anziehen nicht in die Säule gedrückt wird

- Stets den korrekten Typ an Schneidring verwenden und beim Festziehen die Kapillare in die Aufnahme (Säulenkopf) drücken.
- Niemals den Typ Säulenhardware für Kapillaren wechseln, bei denen Stahlschneidringe verwendet wurden.
- UHPLC-Säulen benötigen spezielle Fittingsysteme, um dem höheren Systemdruck standzuhalten.

Systembeitrag zu minimalem ECV – Viper Fitting System

Aufschnitt eines eingeschraubten Viper-Fittings:

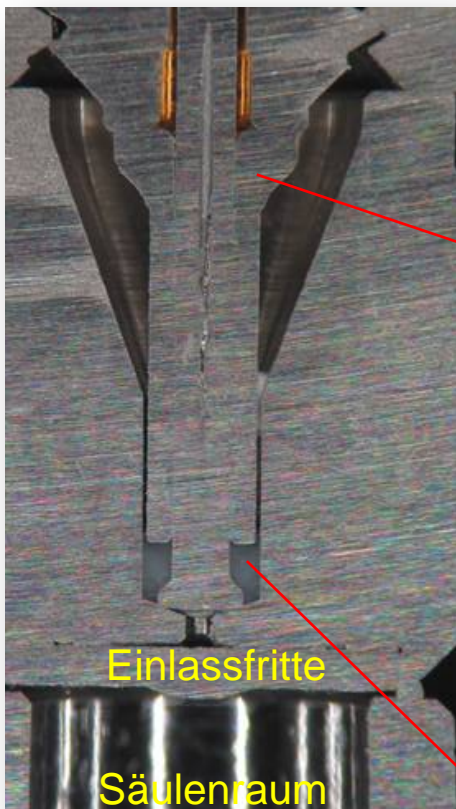
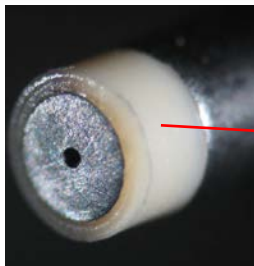


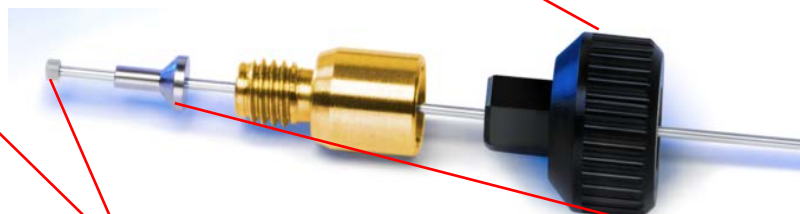
Foto der Stirnseite:



Thermo Scientific™ Viper™ Fitting System



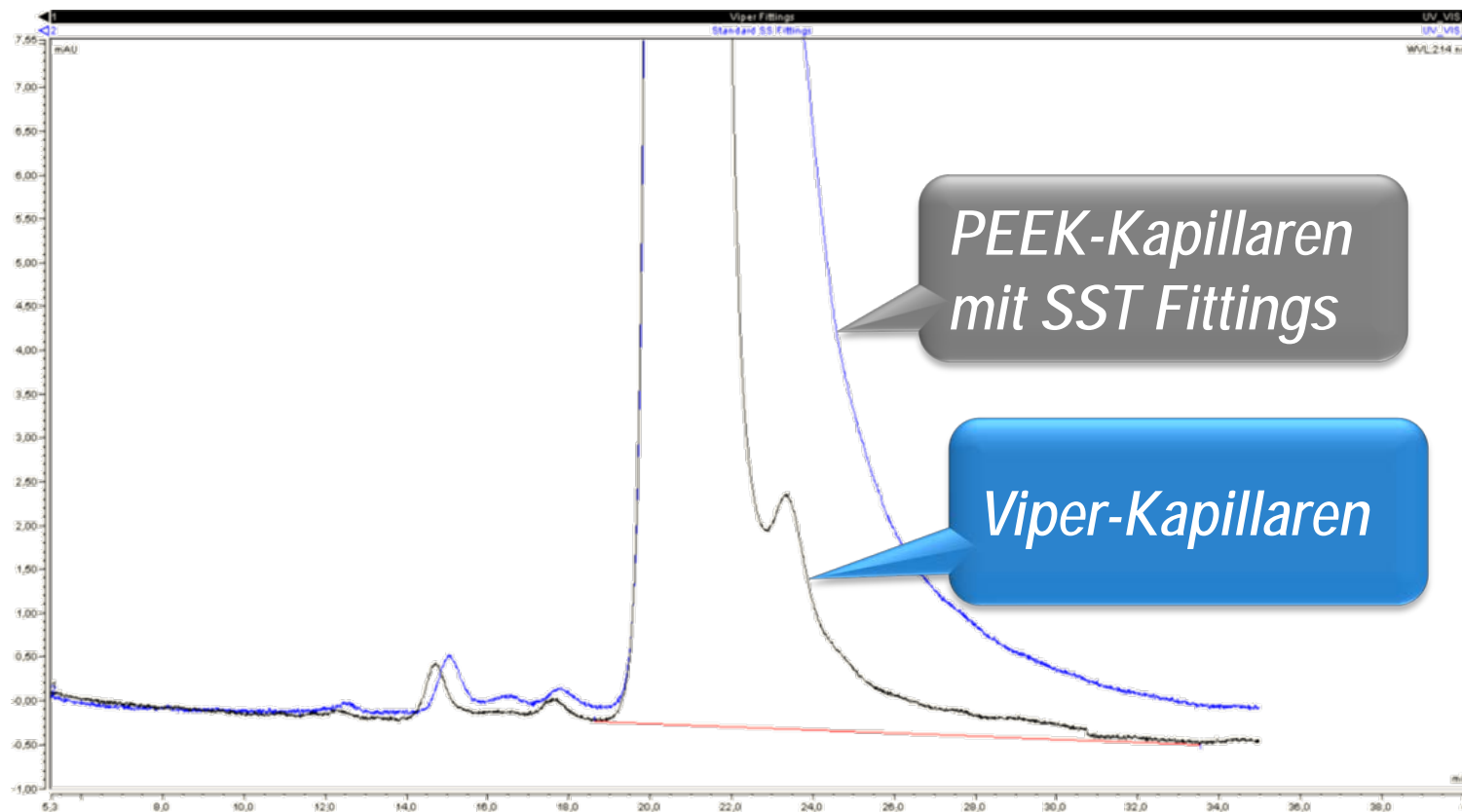
Abnehmbarer Rändel



PEEK™ (Vitrex PLC) Dichtung

Adapter (kein Schneidring!)

Anwendungsbeispiel für bessere Trennung dank Viper Fittings

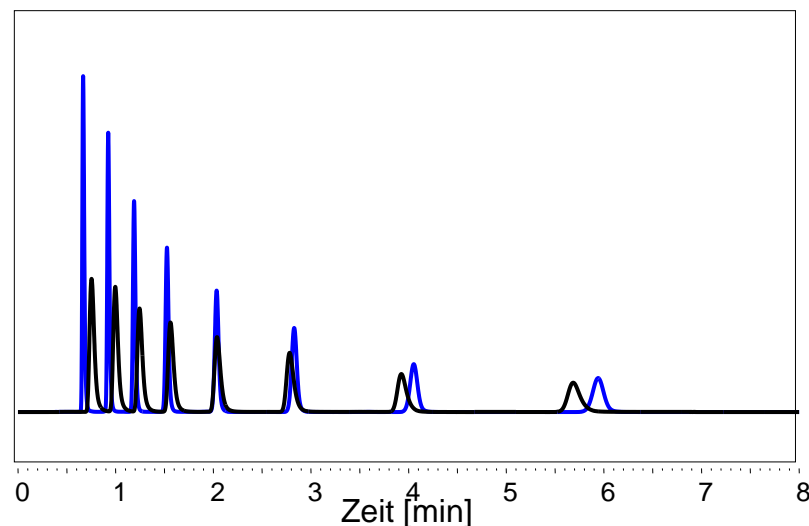


Beide Kapillarsets mit 180 μm i.d.

- Nebenprodukt zur Hauptsubstanz wird durch erhöhte Bandenverbreiterung außerhalb der Säule im klassischen Tubing verdeckt.

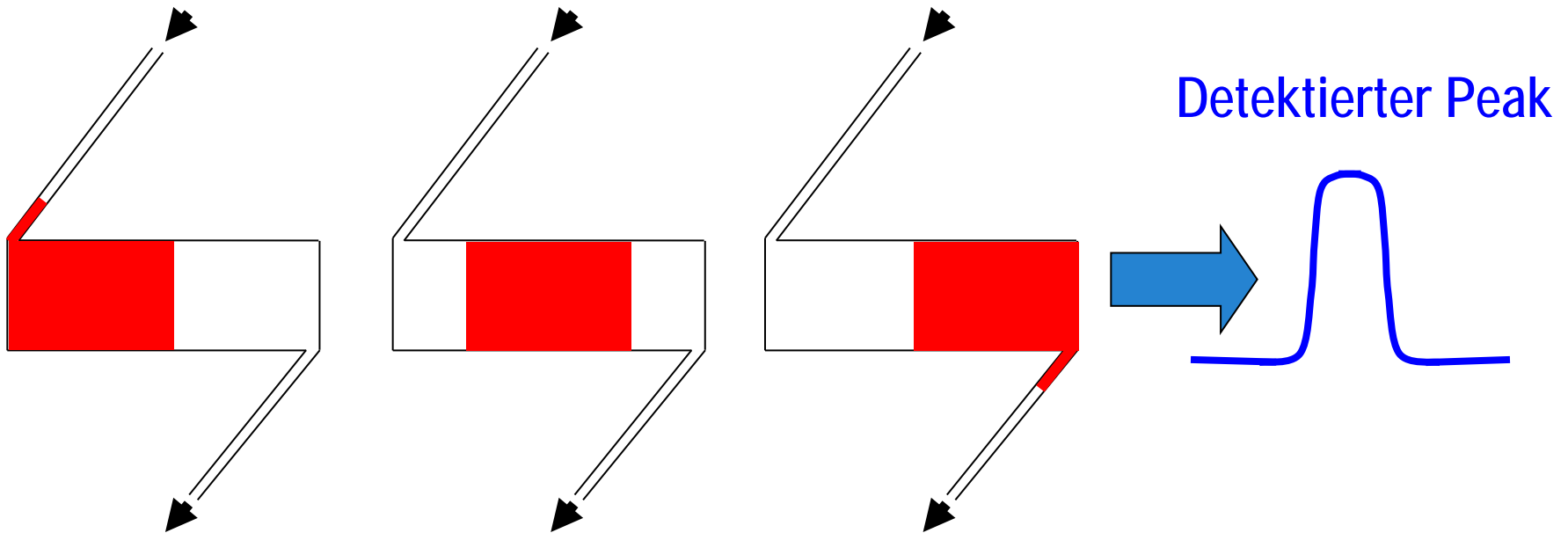
Einflüsse des Außersäulenvolumens (ECV)

- Das ECV wird bei kleineren Säulen (kürzer, geringerer ID) relevanter
- Ein zu großes ECV verursacht
 - eine Peakverbreiterung
 - einen Effizienzverlust der Trennung
- Das ECV kann verkleinert werden durch die Verwendung von
 - Kapillaren mit geringerem Durchmesser
 - Viper Kapillaren

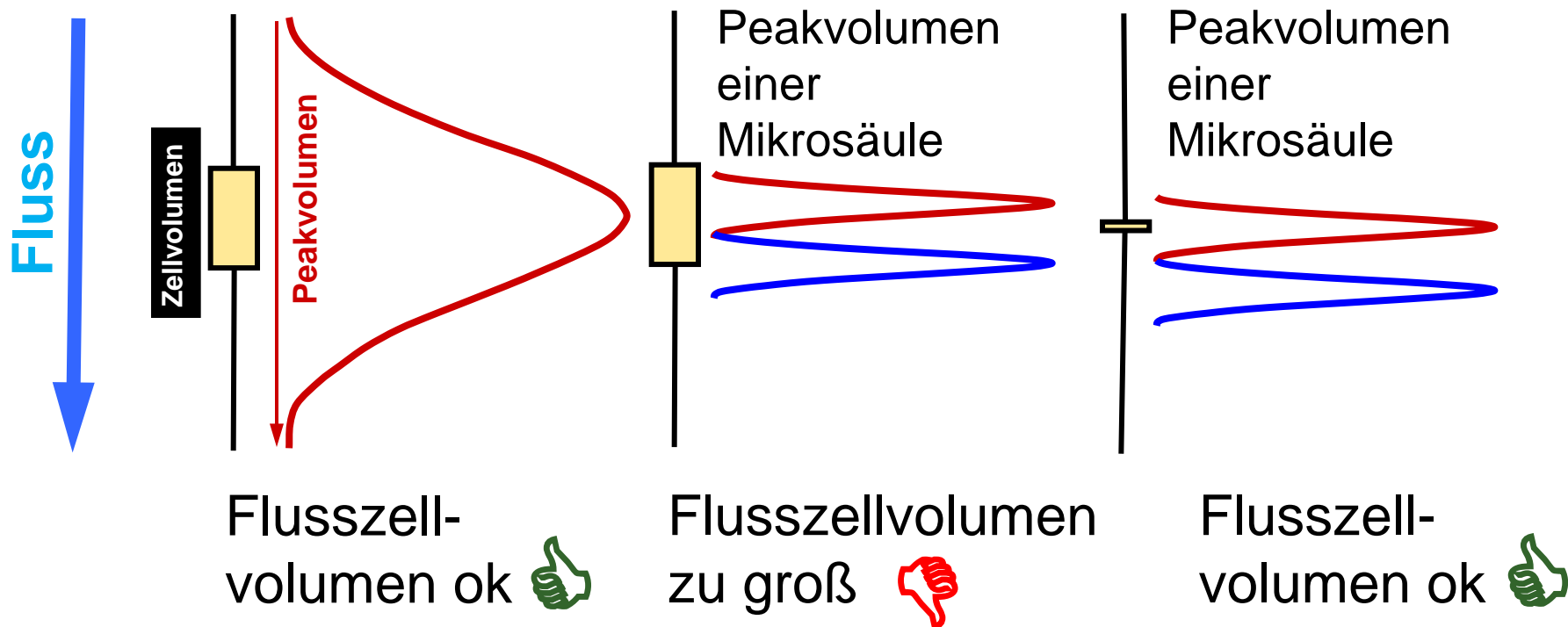


Einfluss des Detektionszellenvolumens

- Was geschieht, wenn ein Peakvolumen in die Zelle eintritt, das deutlich kleiner als das Detektionszellenvolumen ist?



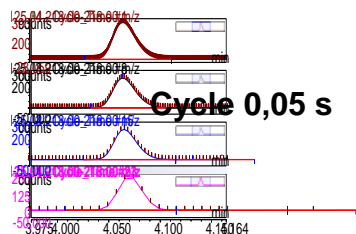
Wie groß darf eine geeignete Detektorzelle sein?



- Ist das Zellvolumen deutlich größer als das Peakvolumen, werden getrennte Peaks in der Messzelle zusammen und nicht separat erfasst.
- Das Volumen der Messzelle sollte höchstens 1/10 des kleinsten Peakvolumens betragen

Datenraten/Zykluszeiten und Retentionszeitpräzision

Wie Datenraten/Zykluszeiten die Retentionszeitpräzision beeinträchtigen



Cycle 0,05 s

20 Hz

Cycle 0,1 s

10 Hz

Cycle 0,2 s

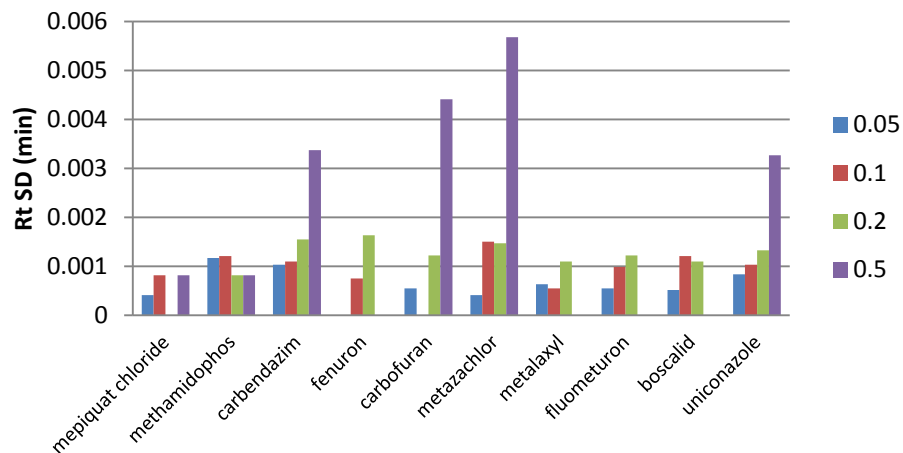
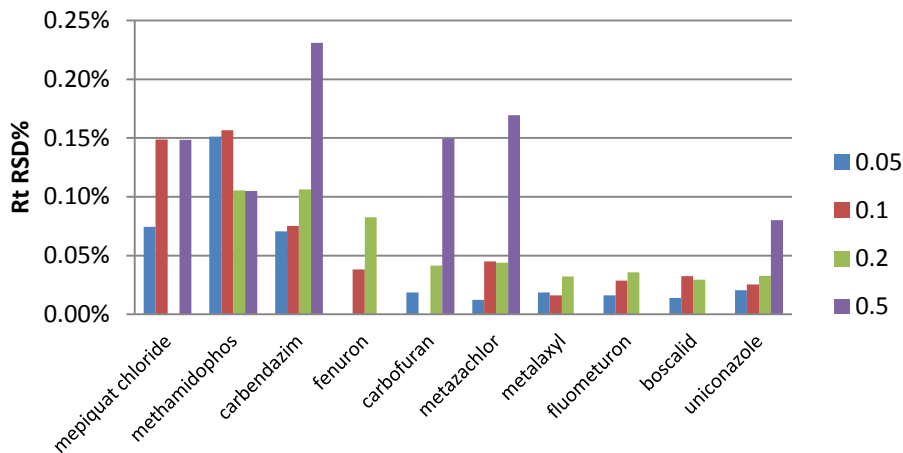
5 Hz

Cycle 0,5 s

2 Hz

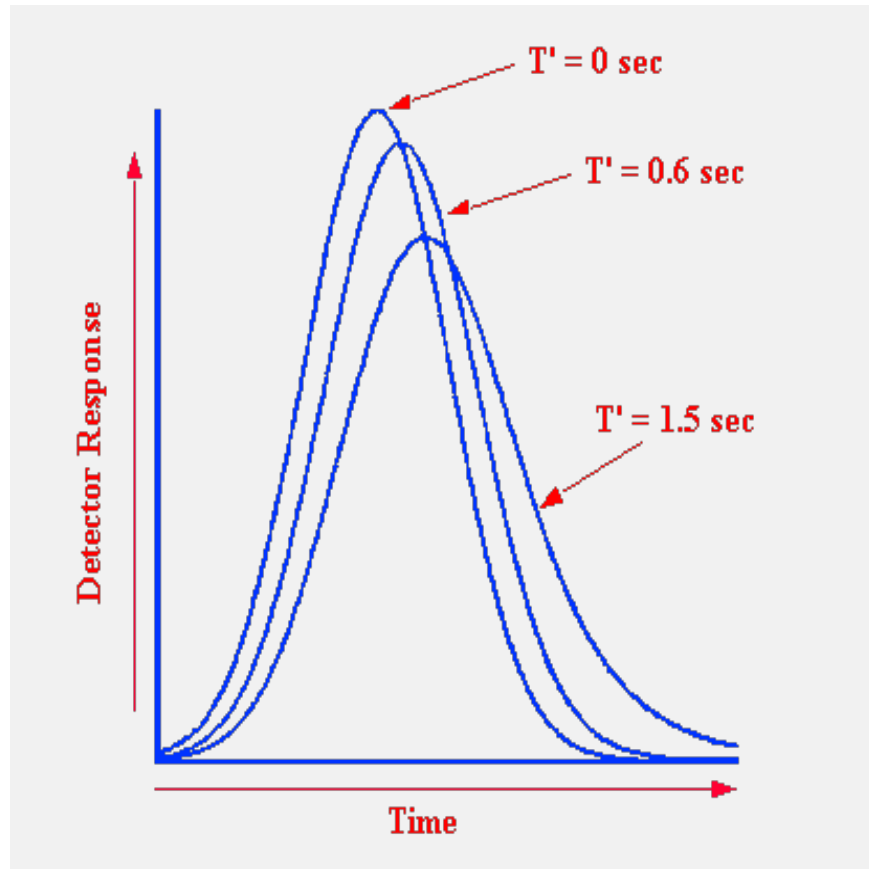
Gemittelte Ergebnisse aus 6 Wiederholungen,
10 ppb Pestizidmix, Thermo Scientific™ Vanquish™
Horizon and Thermo Scientific™ TSQ Quantiva™ LC-MS

Einfluss der MS-Scanrate auf RT Präzision



Mindestens 10 Hz Datenrate sind erforderlich, um eine Retentionszeitpräzision von SD=0.001 min (RSD% < 0,1%) für Peaks einer Halbwertsbreite von 0,025 min (1,5 s) zu erreichen.

Wie verändert eine „Zeitkonstante“ oder „Response Time“ einen Peak?



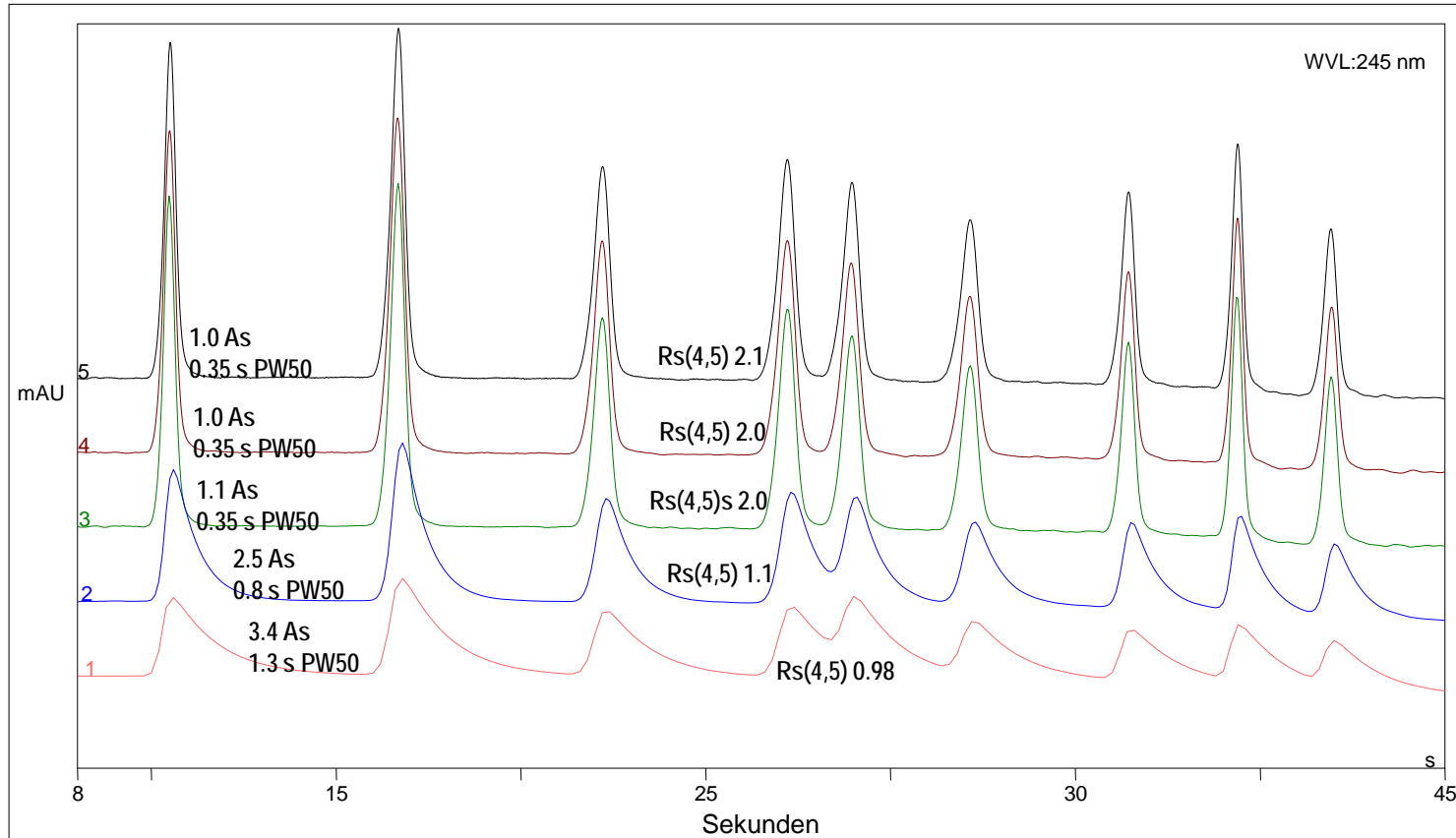
Mit höherer Zeitkonstante/ Response Time:

- nimmt die Peakhöhe ab
- wird der Peak breiter
- nimmt die Retentionszeit zu
- verschlechtert sich die Peaksymmetrie

Allerdings:

- verringert sich das Rauschen (Noise)
- hängt das optimale S/N –Verhältnis von einer ideal zueinander abgestimmten Datenrate **und** Response Time ab

Was passiert, wenn ich die Detektoreinstellungen variiere?



100 Hz, time const 0,01s

50 Hz, time const 0,02s

25 Hz, time const 0,025s

10 Hz, time const 0,5s

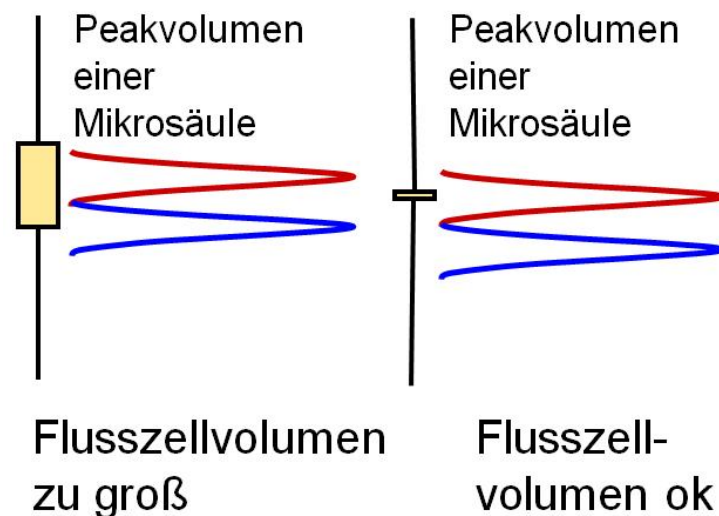
5 Hz, time const 1s

As: Peakasymmetrie; Rs: Auflösung zwischen zwei Peaks

- Kleinere Peaks
- Veränderte Retentionszeiten
- Bis zur Unkenntlichkeit verzerrte Peaks

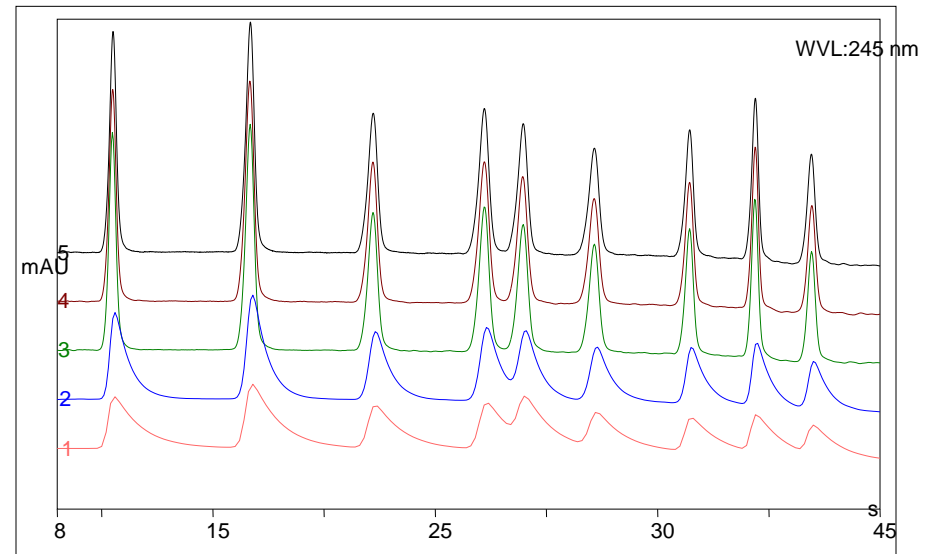
Einflüsse der Flusszelle und der Detektorsettings

- Die optimale Flusszelle sollte
 - so groß wie möglich sein
 - jedoch maximal 1/10 des kleinsten Peakvolumens fassen
- Die optimale Datenrate sollte
 - so klein wie möglich sein um unnötige Datenmengen zu vermeiden
 - so groß wie nötig sein um die Peaks gut abbilden können
 - zusammen mit einer passenden Response Time gewählt werden

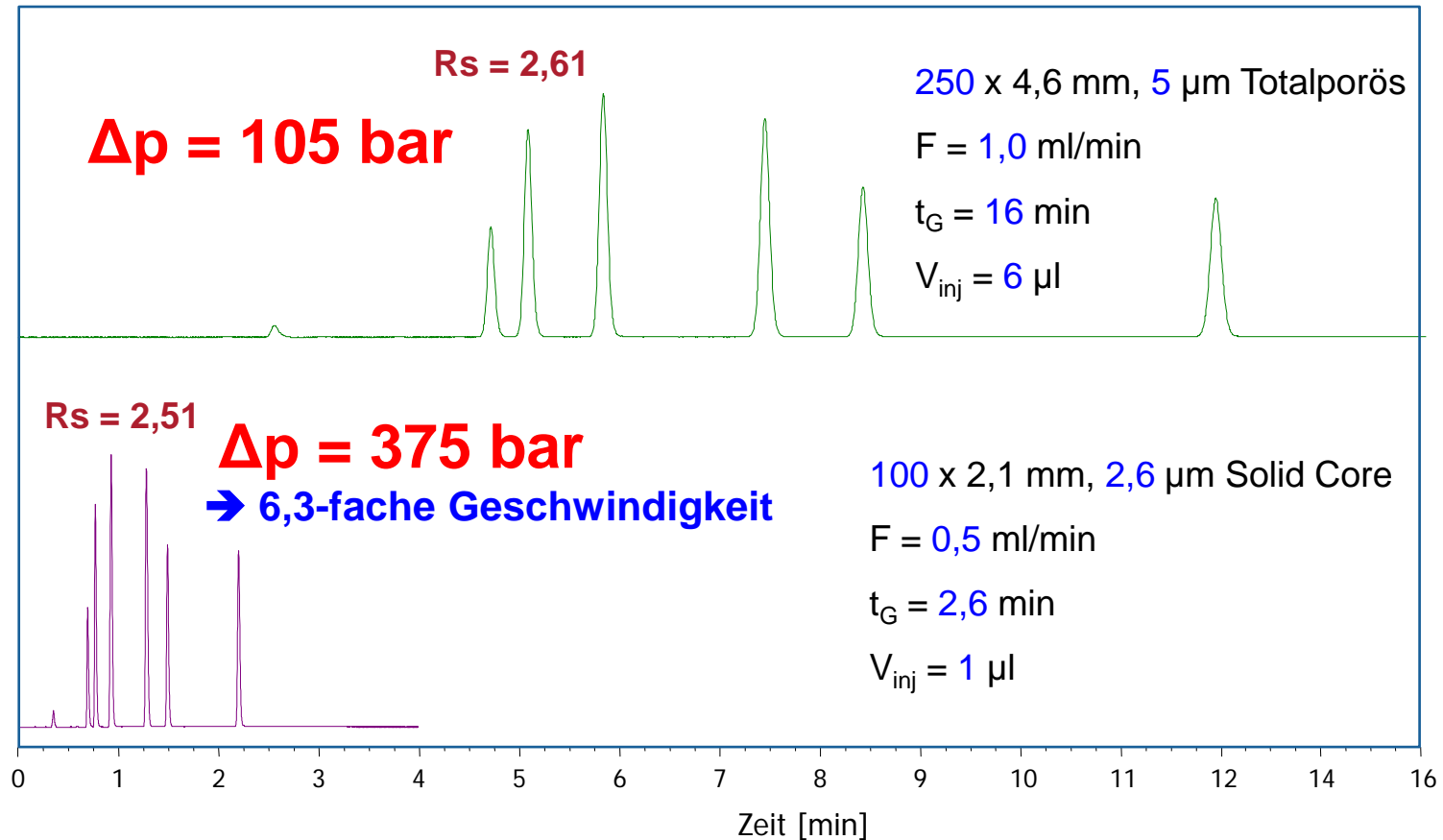


Daumenregeln zu Detektoreinstellungen

- 30-40 Datenpunkte pro Peak zwischen den Integrationsgrenzen sind wünschenswert
- Die Response Time sollte dem Kehrwert der optimalen Datenrate mal 5 entsprechen ($(1/DCR) \cdot 5 = \text{Response Time} = 2,2 \cdot \text{Zeitkonstante}$)
- Bei schlechter Peaksymmetrie (Effizienz) kann ein Verringern der Response Time helfen
- Bei hohem Basislinienrauschen (Noise) hilft ein Vergrößern der Response Time



UHPLC Methode auf HPLC Anlage dank core-shell Technologie



- Auflösung sinkt trotz entsprechender Methodenskalierung wegen Peakverbreiterung in der Fluidik des Analysensystems (und unterschiedlicher Selektivität der beiden Säulen)

Vom HPLC zu UHPLC, was muss ich beachten?

- Möglichst kleine Gradientenverzögerungsvolumina (GDV) - Hochdruckgradientensysteme sind hier bauartbedingt im Vorteil.
- Das GDV ist mehr als nur der Pumpenmischer. Alle Volumina von der Gradientenformung bis zum Säulenkopf tragen bei.
- Der bandenverbreiternde Effekt des Außersäulenvolumens vor der Trennsäule ist im Gradientenmodus dank Bandenrefokussierung meist zu vernachlässigen.
- Hinter der Säule gilt: je kürzer und engerlumiger die Fluidik, desto besser. Der Rückdruck sehr enger Kapillaren sollte beachtet werden, besonders, wenn eine druckempfindliche UV-Messzelle vor einem Massenspektrometer verwendet wird.
- Jeglicher unkontrollierte Beitrag zum Außersäulenvolumen durch unpräzise Kapillarverbindungen etc. sollte so gut wie möglich vermieden werden.
- Das Volumen der Detektormesszelle sollte höchstens 1/10 des kleinsten Peakvolumens betragen.
- Die Datenrate und Response Time / Time Constant sollte auf den schmalsten Peak abgestimmt sein.

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

Bitte wenden Sie sich mit Fragen an
analyze.eu@thermofisher.com.