



ThermoFisher
S C I E N T I F I C

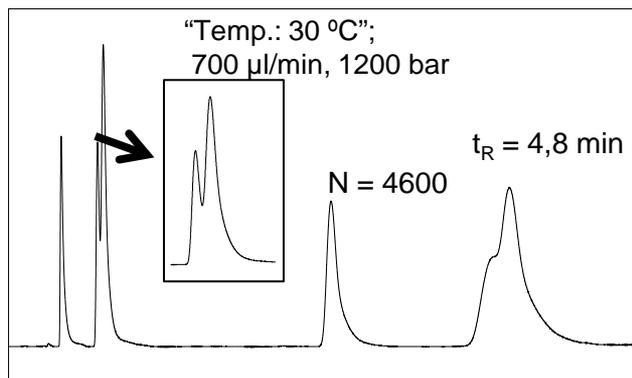
Von HPLC zu UHPLC (III): Was muss ich beim Methodentransfer beachten?

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

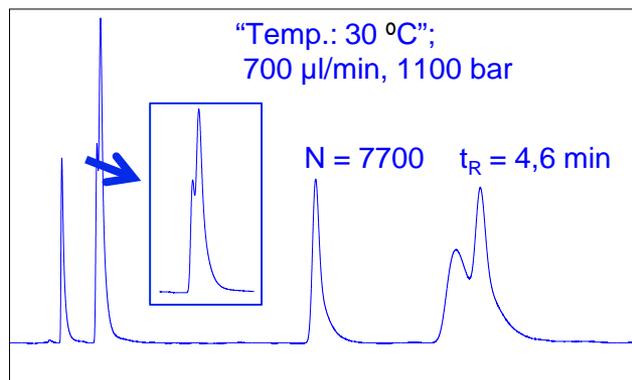


Eine wohlbekannte Situation im Laboralltag

- Warum sieht ein Chromatogramm auf Anlage X...

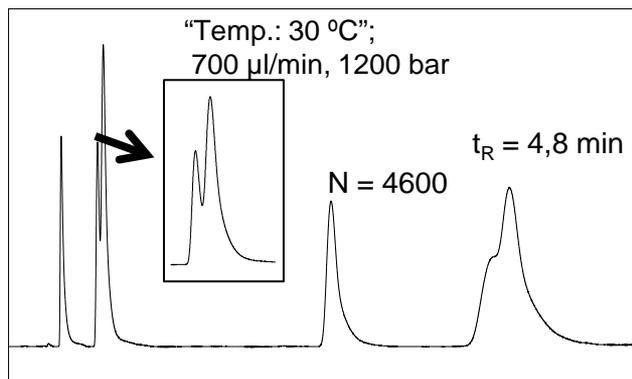


- ...auf Anlage Y so aus?

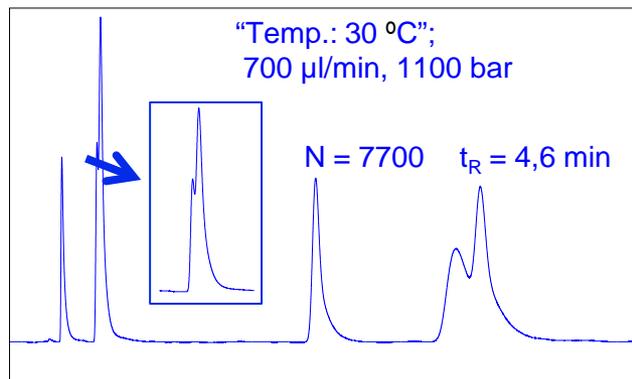


Eine wohlbekannte Situation im Laboralltag

- Warum sieht ein Chromatogramm auf Anlage X...



- ...auf Anlage Y so aus?

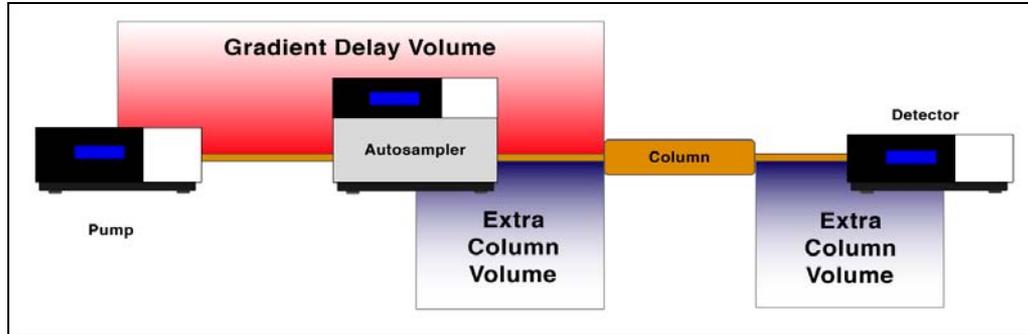


- Ursache sind Unterschiede in der Fluidik...
 - Betrifft insbesondere Gradiententrennungen
 - Wirkt sich besonders auf Retentionszeiten aus
 - Hauptgrund: Gradientenverzögerungsvolumen (GDV)
- ...und in der Art der Temperierung
 - Betrifft isokratische Trennungen ebenso wie Gradiententrennungen
 - Wirkt sich auf Retentionszeiten und auf Peakform (Effizienz) aus
 - Gründe: Funktionsweise des Säulenthmostaten, Eluenten(vor)temperierung



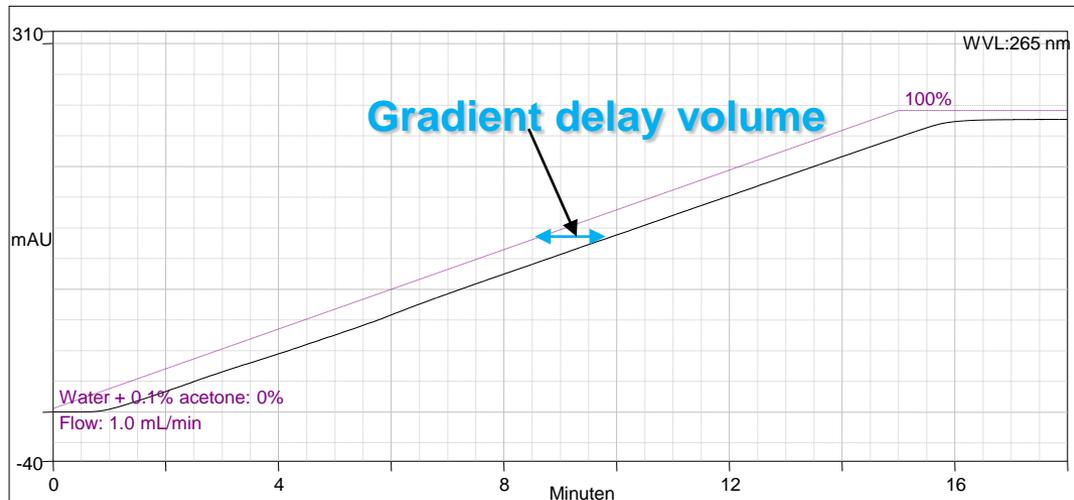
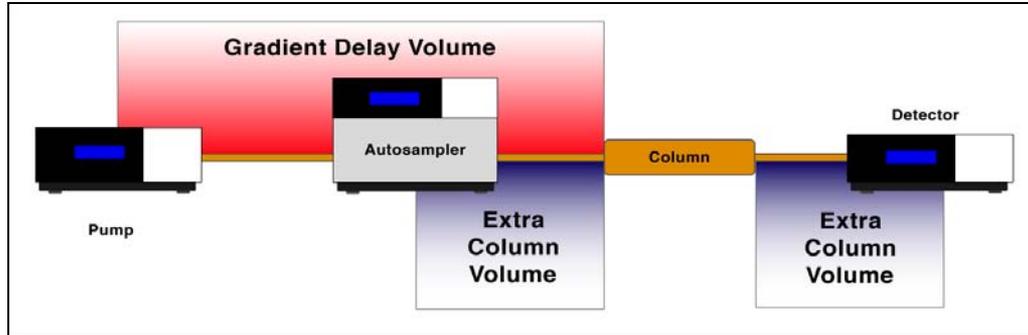
Das Gradientenverzögerungsvolumen oder
Alles beginnt mit dem ersten (isokratischen) Schritt

Das Gradientenverzögerungsvolumen (GDV)



- GDV beeinflusst bzw. erzeugt
 - eine isokratische Stufe zu Beginn jeder Gradiententrennung
 - Schärfe des Gradienten
 - Nötige Äquilibrierungszeit und damit die Gesamtanalysendauer
- Schwach retardierte Substanzen sind meist mehr vom GDV-Einfluss betroffen als spät eluierende.

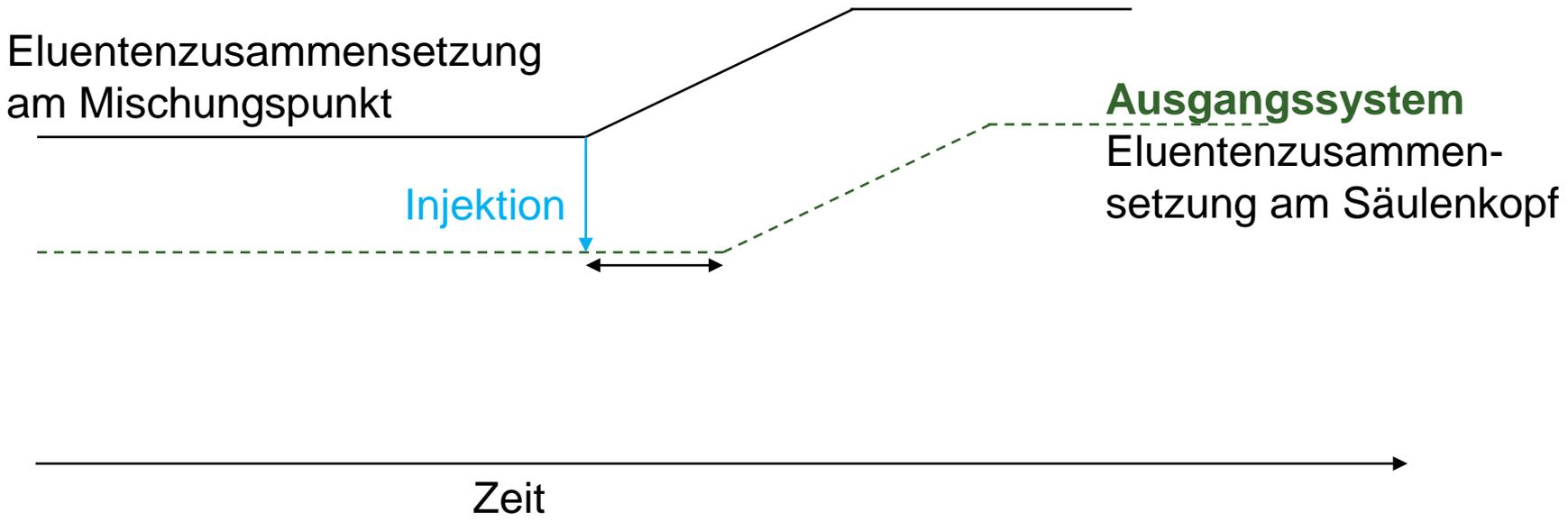
Das Gradientenverzögerungsvolumen (GDV)



- GDV beeinflusst bzw. erzeugt
 - eine isokratische Stufe zu Beginn jeder Gradiententrennung
 - Schärfe des Gradienten
 - Nötige Äquilibrierungszeit 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

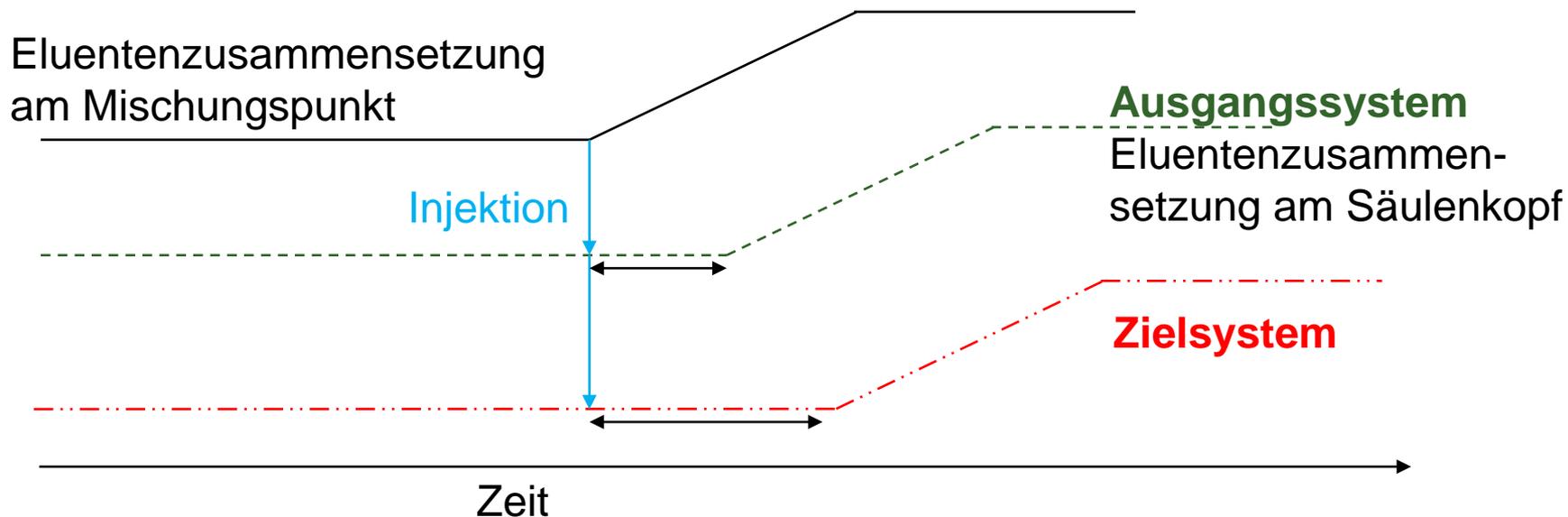


Wie beeinflusst das GDV meinen Methodentransfer?





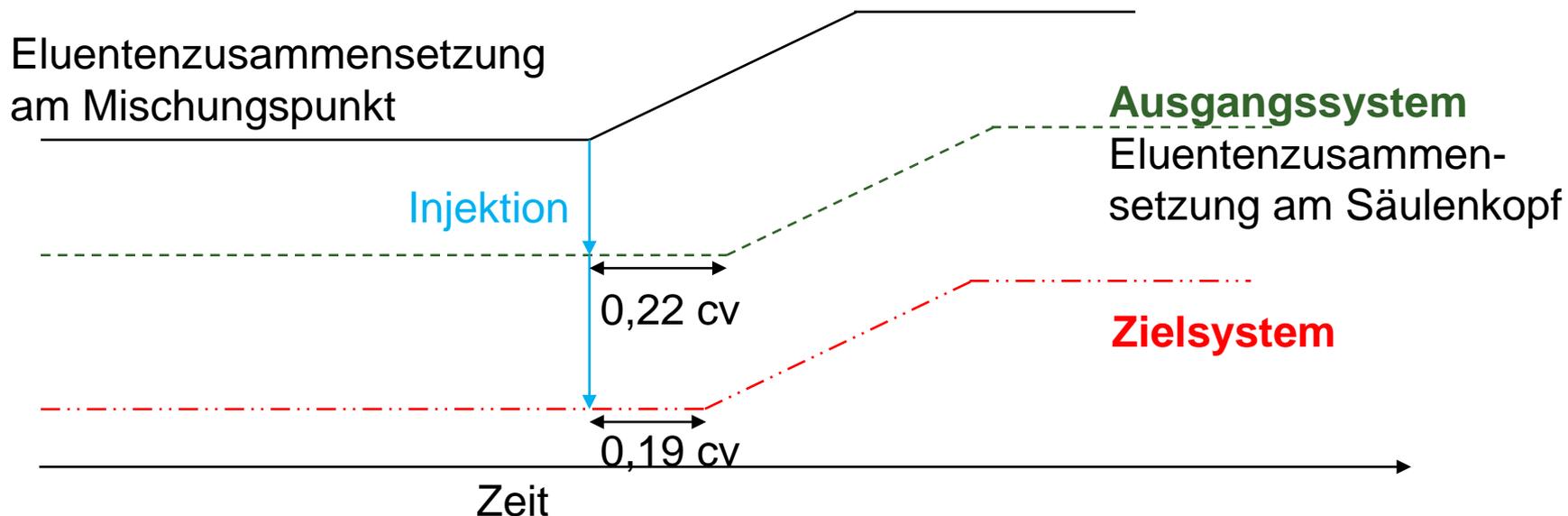
Wie beeinflusst das GDV meinen Methodentransfer?



- Vergleiche die GDVs (ausgedrückt als GDV pro Säulenvolumen)
- Wenn das Zielsystem ein kleineres isokratisches Segment liefert:
 - füge einen Halteschritt vor dem Gradientenprogrammstart hinzu, um gleichen isokratischen Vorlauf zu gewährleisten
- Wenn das Zielsystem ein größeres isokratisches Segment liefert:
 - Minimiere das isokratische Segment (z.B. mit Microflow Kits, kleinerem Tubing ID, Autosampler Bypass)



Wie beeinflusst das GDV meinen Methodentransfer?



Originalsystem mit 0,9 ml GDV und 4,15 ml CV:

0,22 GDV pro Säulenvolumen

$$GDV_{per}(CV) = \frac{GDV}{CV}$$

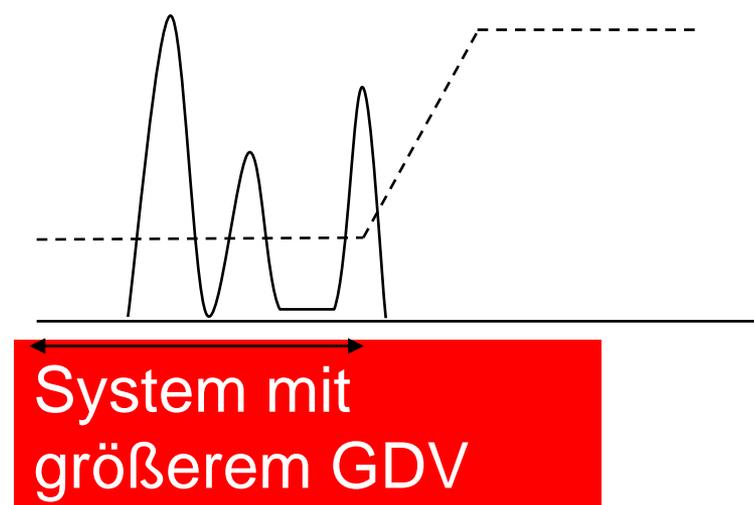
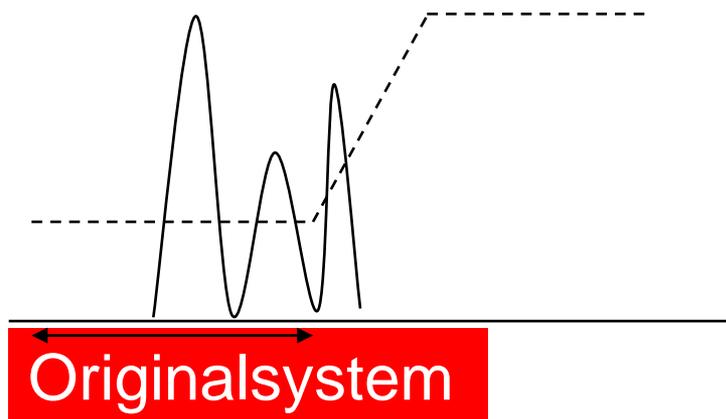
Zielsystem mit 0,1 ml GDV und 0,52 ml CV:

0,19 GDV pro Säulenvolumen

- **Ändere das Verhältnis aus GDV und Säulenvolumen so wenig wie möglich!**



Verschiedene GDVs und ihr Einfluss auf früh eluierende Peaks

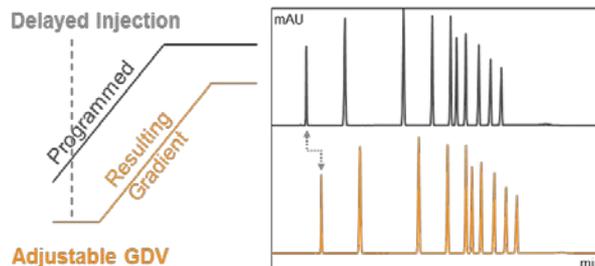




Wie ein UHPLC-System die GDV-Situation entschärfen kann

• Größeres GDV benötigt

- Zusätzliche Volumina im Flusspfad einfügen:
 - Individuell verstellbares Metering Device im Probengeber zur Justage des GDV
 - Mixer und (Viper) Kapillarverbindungen anpassen
- Isokratischen Halteschritt am Beginn der Trennmethode einfügen



• Kleineres GDV benötigt

- Volumina im Flusspfad verkleinern:
 - Individuell verstellbares Metering Device im Probengeber zur Justage des GDV
 - Mixer und (Viper) Kapillarverbindungen anpassen
- Zeitverzögerte Injektion zum Programmstart (Delayed Injection)



Chromleon



Pump H and F



Sampler HT and FT



Vanquish Horizon



Vanquish Flex



UltiMate 3000 (Bio)RS



Thermostatisierung in der UHPLC oder Some like it hot

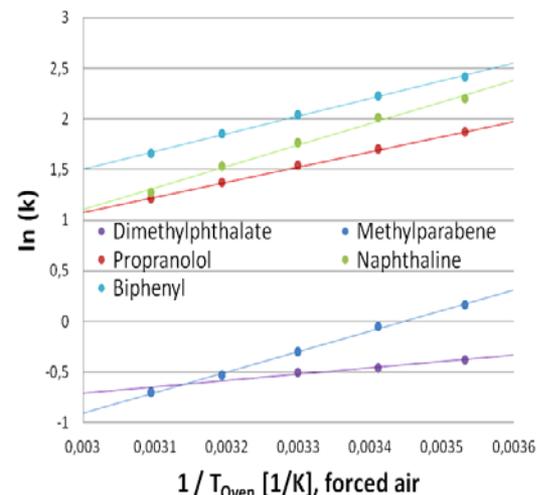
Die Rolle der Temperatur in der UHPLC-Trennung

- Temperatur ist ein kritischer Faktor zur Optimierung der Selektivität
- Retention verhält sich invers zur Temperatur:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \beta \quad (\text{Van't Hoff-Gleichung})$$

$$\ln k \sim \frac{1}{T}$$

- Selbst geringe Temperaturänderungen können Änderungen der Elutionsreihenfolge bewirken.



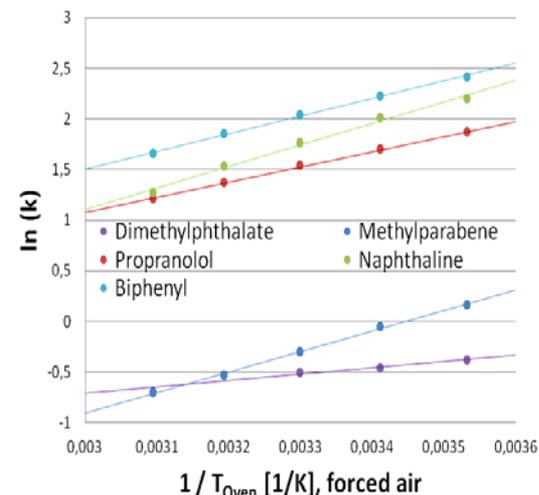
Die Rolle der Temperatur in der UHPLC-Trennung

- Temperatur ist ein kritischer Faktor zur Optimierung der Selektivität
- Retention verhält sich invers zur Temperatur:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \beta \quad (\text{Van't Hoff-Gleichung})$$

$$\ln k \sim \frac{1}{T}$$

- Selbst geringe Temperaturänderungen können Änderungen der Elutionsreihenfolge bewirken.
- Hoher Druck in der UHPLC erzeugt Reibungswärme in der Säule
- Zwei Bauformen von Säulenthermostaten:
 - Umluftthermostaten (Forced Air) – stete Umwälzung der Luft im Säulenraum
 - Ruhluftthermostaten (Still Air) – keine Luftumwälzung, Ziel ist thermische Isolierung der Trennsäule



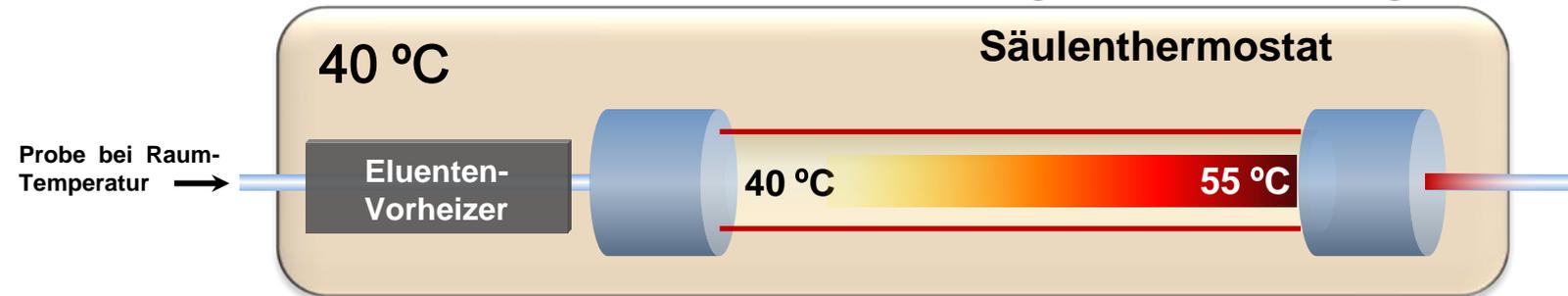
- Bei UHPLC-Methoden, die in der Säule messbar durch viskose Reibung die Temperatur erhöhen, führt ein Ruhluft-Thermostat immer zu besserer chromatographischer Auflösung wegen der erzielten höheren Bodenzahlen.
- Kritisch betrachtet:
 - Das ist oft richtig, kann aber auch anders sein, wenn die damit verbundene erhöhte Säulentemperatur zu einer geringeren Selektivität kritischer Paare führt.

Temperatureffekt bei viskoser Reibung in der Säule

HPLC-Säule betrieben ohne wesentliche Aufheizung durch Reibung:



UHPLC-Säule unter deutlicher Aufheizung durch Reibung :

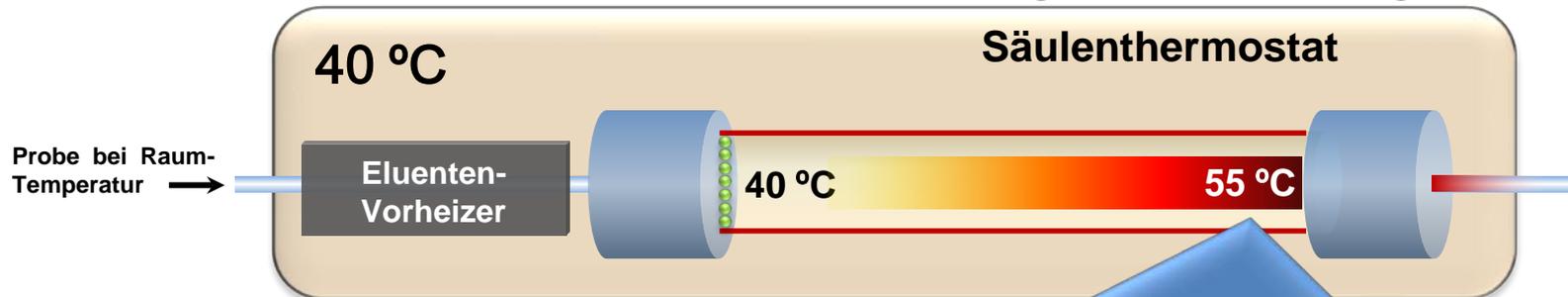


Temperatureffekt bei viskoser Reibung in der Säule

HPLC-Säule betrieben ohne wesentliche Aufheizung durch Reibung:



UHPLC-Säule unter deutlicher Aufheizung durch Reibung :



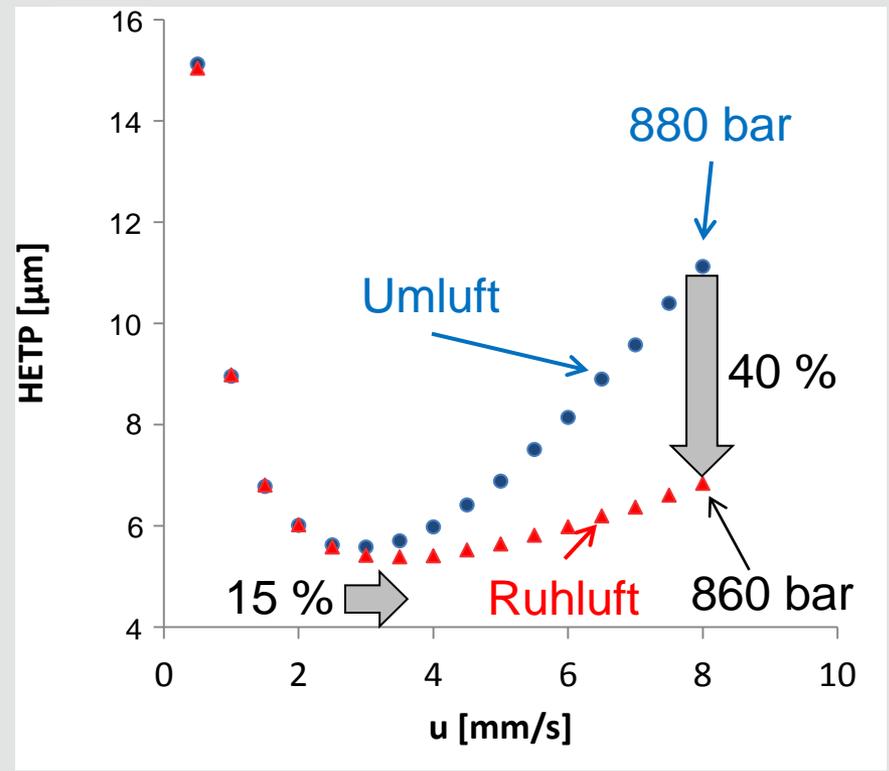
Mismatch durch radialen Temperaturgradienten:

- Säule heizt sich im Zentrum deutlich über Thermostaten-Temperatur auf
 - Niedrigere Viskosität, höhere Lineargeschwindigkeit
 - Niedrigere Retention

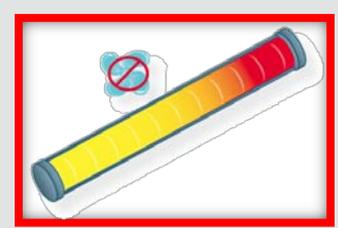
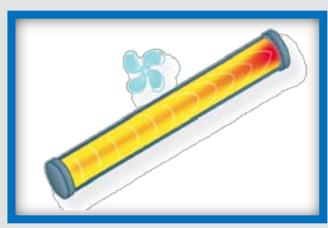
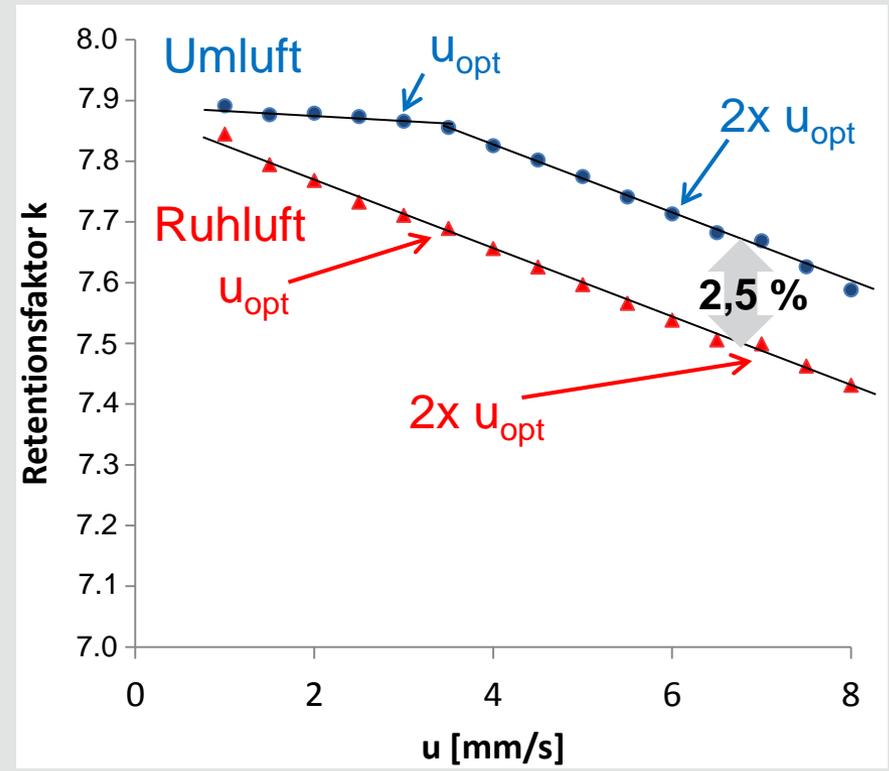


Einfluss der Reibungswärme auf Effizienz und Retention

Effizienz:



Retention:



Säule: Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™, 1,9 µm, 2,1 x 100 mm
 Mobile Phase: 50% Wasser/ 50% Acetonitril
 Probe: Hexanophenon
 Temperatur: CC und Pre-Heater 30 °C, Umluft bzw. Ruhluft

Gemessene Temperaturerhöhung in beiden Modi

Experimentelle Bedingungen:

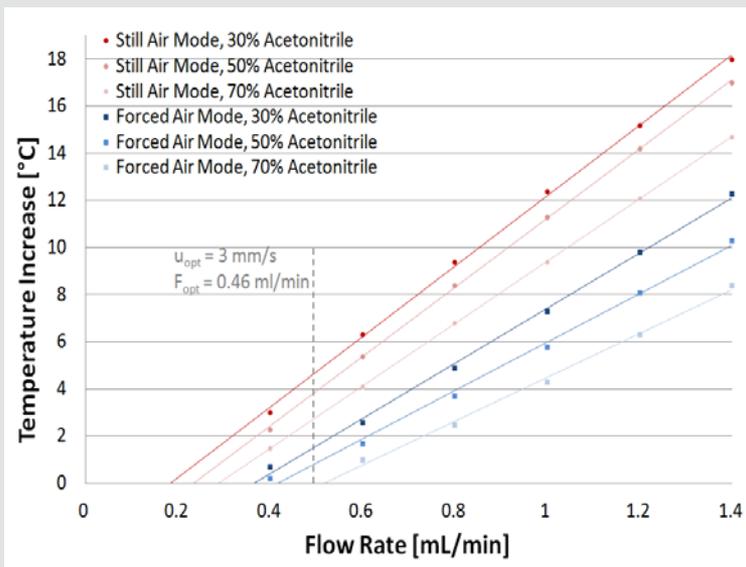
Instrument: Thermo Scientific Vanquish Horizon UHPLC System

Säule: Thermo Scientific Hypersil GOLD, 1,9 μm ,
2,1 x 100 mm

Eluent: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$

Flussrate: bis zu 1,40 ml/min

Temperatur: 30 °C (Säulentermostat und
Eluentenvorheizer)

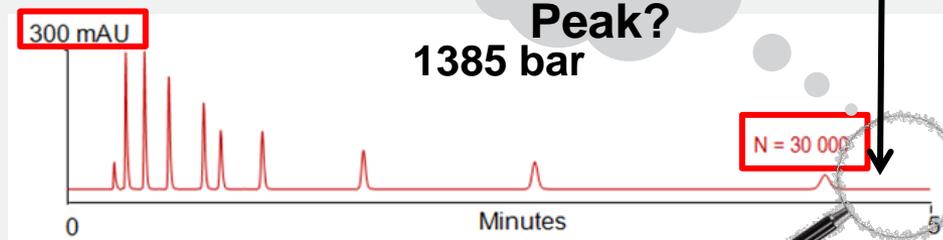
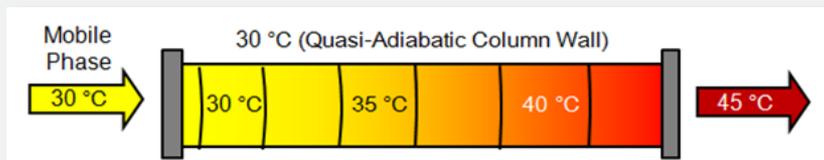
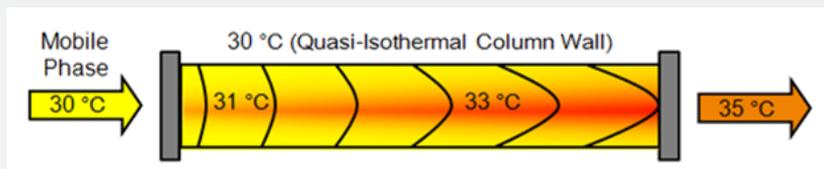


50% Acetonitril	Ruhluft Modus		Umluft Modus	
	Flussrate [ml/min]	Rückdruck [bar]	Temperatur- Zunahme [°C]	Rückdruck [bar]
0,2	173	0,0	177	0,0
0,4	343	2,3	356	0,2
0,6	506	5,4	527	1,7
0,8	659	8,4	685	3,7
1,0	809	11,3	830	5,8
1,2	958	14,2	975	8,1
1,4	1079	17,0	1099	10,3

Viskose Reibung bei 1400 bar und Effekte

Experimentelle Bedingungen:

Säule:	Thermo Scientific™ Accucore™ Vanquish™ C18, 1,5 µm, 2,1 x 100 mm
Probe:	Uracil, Acetanilid und 8 Phenone
Inj. Volumen:	1 µl
Eluent:	45:55 H ₂ O:ACN (v/v)
Flussrate:	0,65 ml/min
Thermostatisierung:	Compartment und aktiver Vorheizer auf 30 °C, Fan Speed 5 (Umluft) oder Fan Speed 0 (Ruhluft)



Wo ist mein Peak?

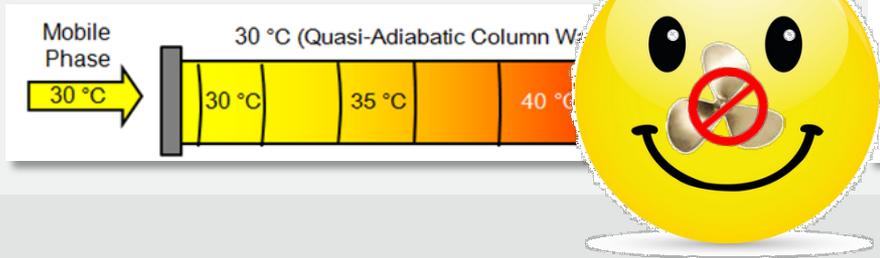
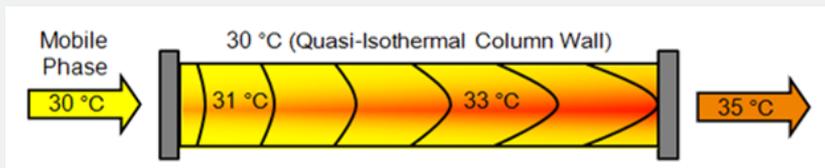




Viskose Reibung bei 1400 bar und Effekte

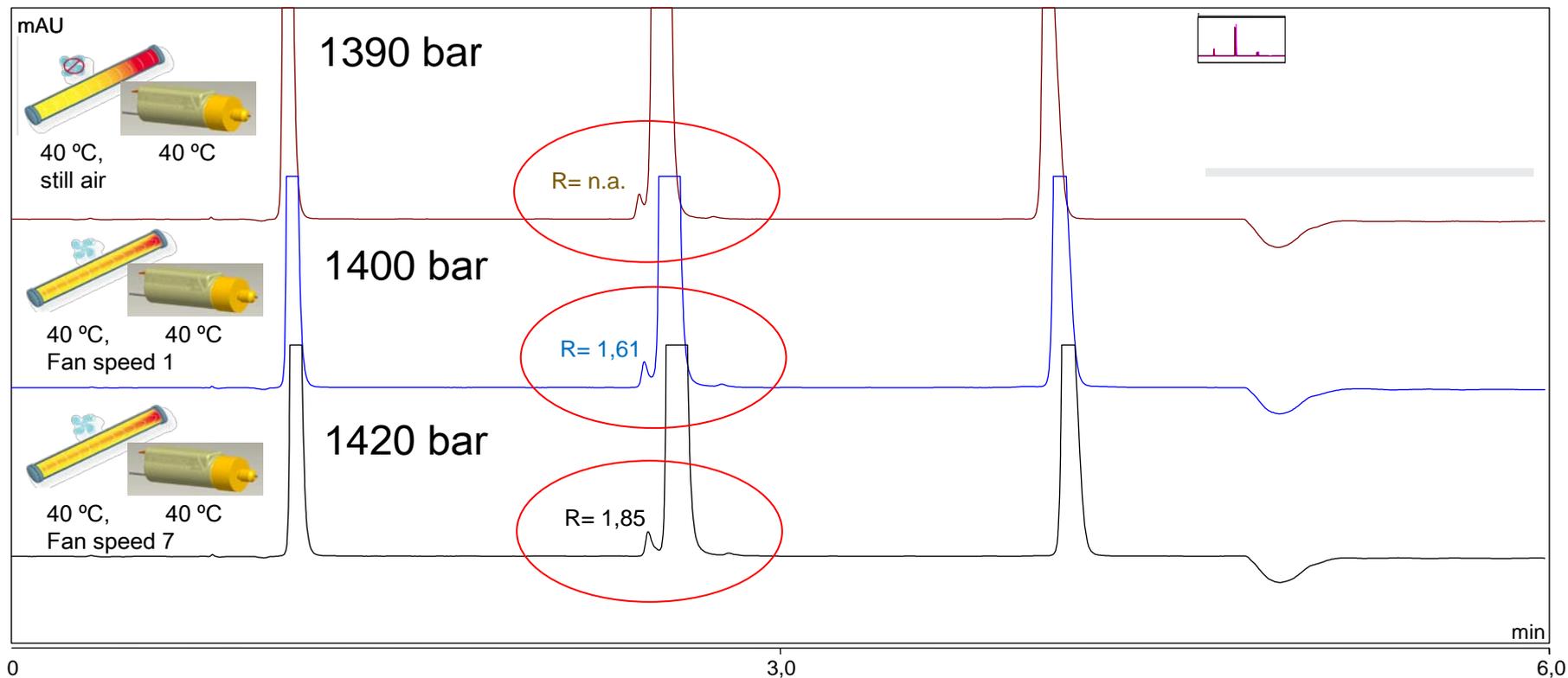
Experimentelle Bedingungen:

- Säule:** Thermo Scientific™ Accucore™ Vanquish™ C18, 1,5 µm, 2,1 x 100 mm
- Probe:** Uracil, Acetanilid und 8 Phenone
- Inj. Volumen:** 1 µl
- Eluent:** 45:55 H₂O:ACN (v/v)
- Flussrate:** 0,65 ml/min
- Thermostatisierung:** Compartment und aktiver Vorheizter auf 30 °C, Fan Speed 5 (Umluft) oder Fan Speed 0 (Ruhluft)



➔ Ruhluft ist vorteilhaft

Fan Speed Variation bei einer anderen Methode



- Erhöhte Umluft senkt die Säulentemperatur
- Die Selektivität für den Verunreinigungspeak steigt

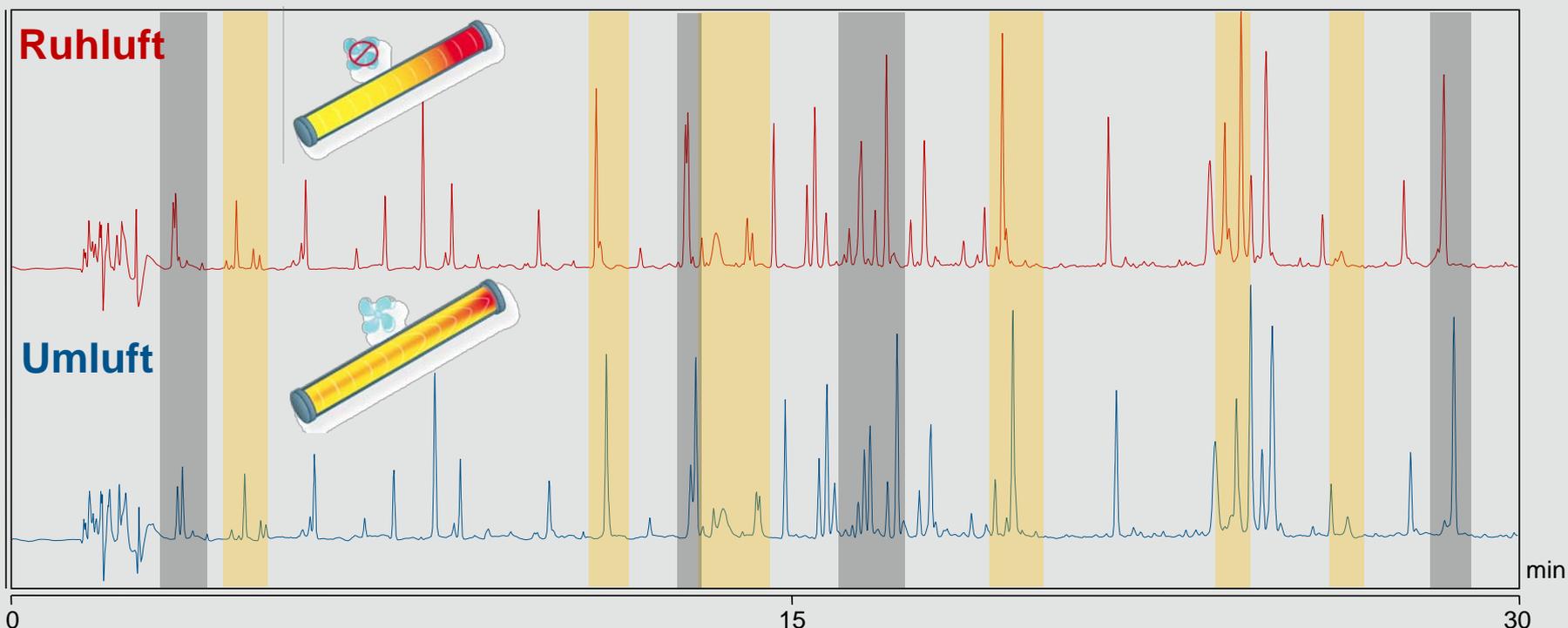


Instrument: Vanquish Horizon UHPLC System
Gradient: Von 5% bis 30% B in 4 min,
A: 0,1% Ameisensäure in H₂O, B: ACN
Säule: Hypersil GOLD VANQUISH, 1,9 µm, 2,1 x 200 mm
Probe: Gemisch von Gallensäure, Kaffeesäure und Salicylsäure
Detektion: UV 300 nm, 20 Hz, 0,2 s response time
Flussrate: 0,8 ml/min



Umluft ist vorteilhaft

Säulenthmostatisierung bei Peptide Mapping



Vanquish Horizon UHPLC System mit 10 mm Thermo Scientific™ Lightpipe™ Flow Cell

Säule: Thermo Scientific™ Acclaim™ RSLC 120 C18, 2,2 µm, 2,1 x 250 mm

Probe: 1 µL Monoclonal IgG Tryptic Digest (2 mg/ml)

Detektion: 214 nm, 100 Hz

Temperatur: CC und Pre-heater 80 °C, **still air** oder **forced air**

Mobile Phase A: TFA 0,05% in Wasser

Mobile Phase B: TFA 0,05% in 2/8 Wasser/ACN

Flussrate: 400 µl/min

Gradient: von 4% bis 55% B in 30 min

Vorteil Ruhluft Modus → Partiiell bessere Auflösung durch bessere Effizienz

Vorteil Umluft Modus → Partiiell bessere Auflösung durch bessere Selektivität

Beide Modi sind komplementär



Diese Effekte sind relevant bei Methoden über 500 bar:

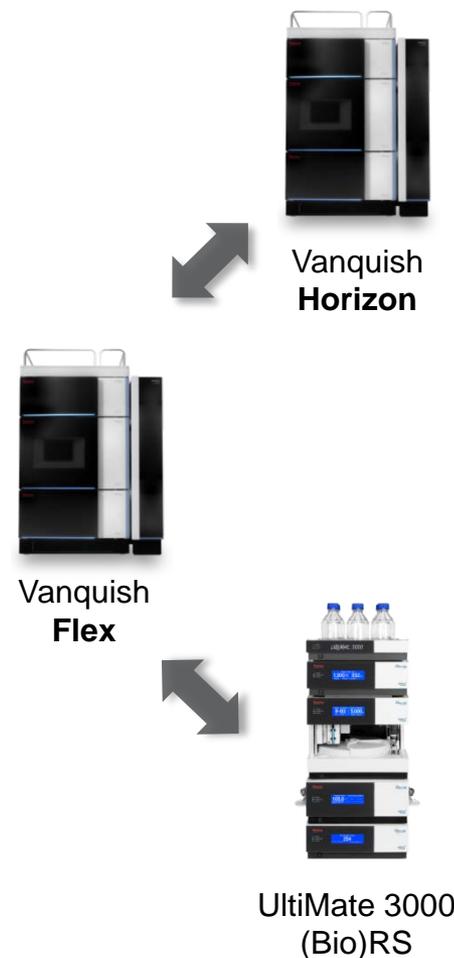
- Die Luftzirkulation im Säulenthermostaten ist grundsätzlich geräteabhängig
- Ruhluftthermostaten zeigen meist bessere Auflösungen bei Reibungswärme
- Verschiedene Thermostaten können selbst bei gleicher effektiver Temperatur zu verschiedenen Chromatogrammen führen

Tipps:

- Umluft variieren falls möglich (Vanquish UHPLC Systeme)
- Säule in Umluftthermostaten versuchsweise isolieren
- Säulenposition im Thermostaten versuchsweise variieren

Gradientenverzögerungsvolumina

- Das GDV bestimmt, wie lange die isokratische Vortrennung in einer Gradientenelution anhält.
- Kenntnis und Anpassung des GDV sind entscheidend für den Erfolg einer Methodenübertragung.
- Unterschiedliche GDV zweier Anlagen
 - lassen sich fluidisch anpassen (z.B. durch Teiletasch)
 - oder durch Änderung der Gradientenprogrammierung kompensieren
- Ein individuell verstellbares Metering Device im Probengeber der Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC-Systeme erlaubt die komfortable, automatisierbare Justage des GDV .



Thermostatisierung

- Säulenthermostaten werden häufig unterschätzt – „Ofen ist nicht gleich Ofen“
- Ihre Funktionsweise hat maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis einer Methodenübertragung
- **Ruhluftthermostaten (Still Air)**
 - halten Reibungswärme in der Säule.
 - Dies führt in der Regel zu besserer Effizienz und schmalere Peaks.
 - Die innere Aufheizung der Säule kann jedoch Selektivitäten ändern.
- **Umluftthermostaten (Forced Air)**
 - führen Wärmetönung von der Säulenoberfläche ab.
 - Dies führt oft zu Peakverzerrung wegen ungleicher Temperaturverteilung über den Säulenquerschnitt.
- Beide Modi sind komplementär und können zum Feintuning einer Methode benutzt werden.



Vanquish
Horizon



Vanquish
Flex



UltiMate 3000
(Bio)RS

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