

HPLC im Spannungsfeld zwischen Auflösung und Probedurchsatz

Thomas Welsch, v. Universität Ulm, Institut für Analytische und
Bioanalytische Chemie, Ulm, Deutschland
thomas.welsch@uni-ulm.de

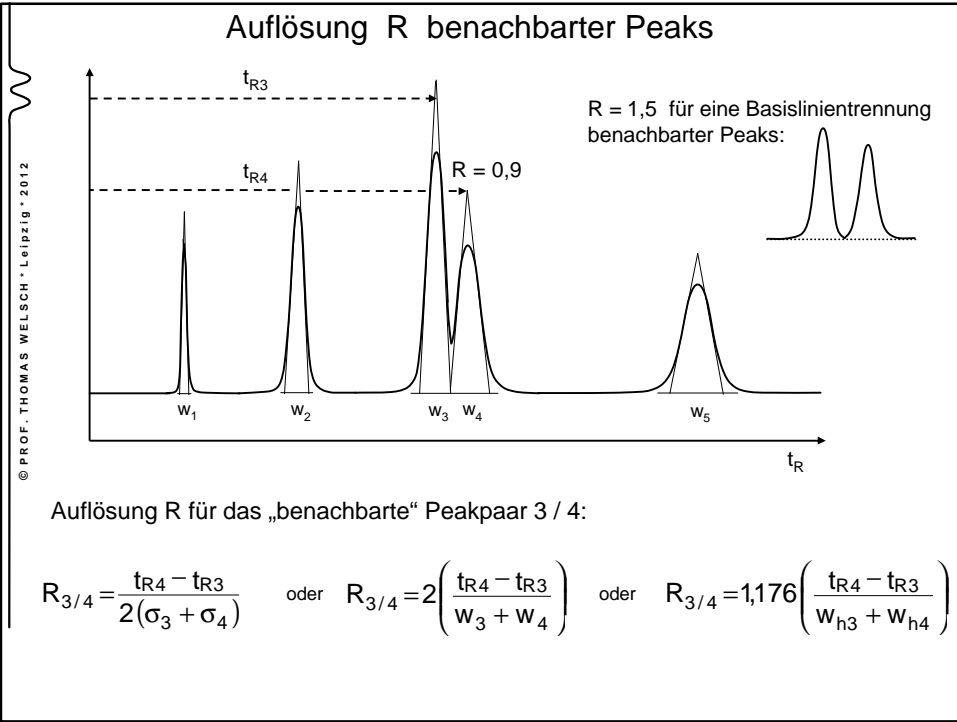
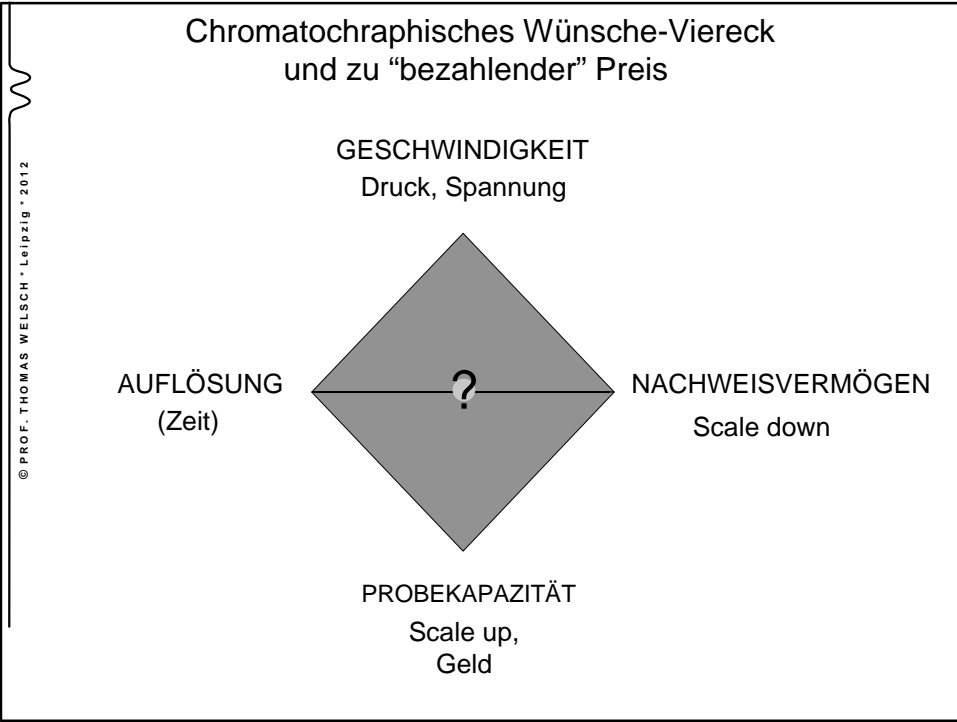
APPLICA

TZ Oekolampad, Basel, Schweiz
16. Oktober 2012

Trennanalytik im Wandel
Schneller - Selektiver - Sensitiver

Zielsetzungen bei der chromatographischen (chromatographisch-spektroskopischen) Analytik

- Trennung und Detektion aller in einem Gemisch enthaltenen Komponenten in einem definierten Konzentrationsbereich
- Trennung und Detektion aller nachzuweisenden / aller zu bestimmenden Komponenten
- Geringe Analysenzeit / hoher Probedurchsatz
- Bestimmung von geringen Konzentrationen bei begrenzter Probenmenge
- Hohe Robustheit der Methode / des Analyseverfahrens
- Moderate Betriebsparameter
- Geringe Kosten



Einfluss von Retention (k), Selektivität (α) und Effizienz (N)

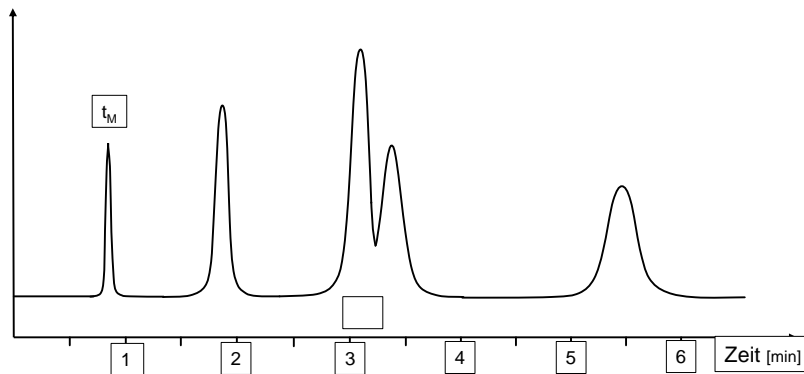
© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

$$R \propto \sqrt{\frac{L}{d_p}} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1}$$

Einfluss des Retentionsfaktors k auf die Auflösung

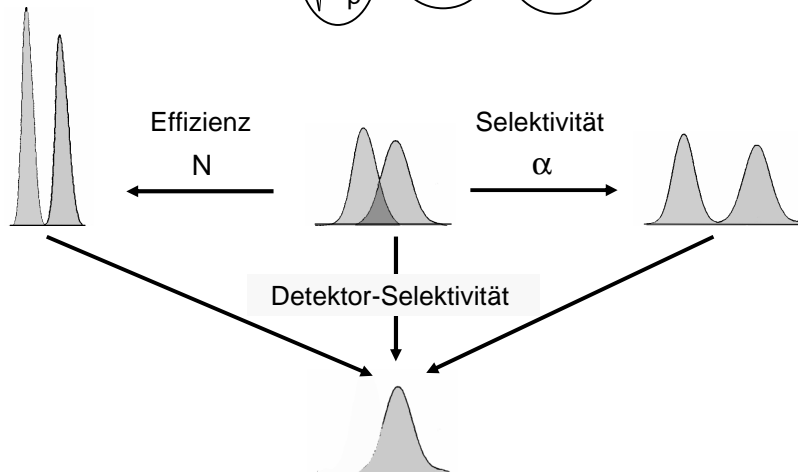
© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

$t_R =$	0,80	1,78	3,10/3,36	5,41	min
$k =$	0	1,23	2,88/3,20	5,76	
$\frac{k}{k+1} =$		0,55	0,74/0,76	0,85	



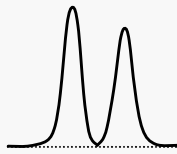
Verbesserung der Auflösung durch Erhöhung der Selektivität oder Verringerung der Dispersion (Peakbreite)

$$R = \frac{1}{4} \left(\sqrt{\frac{L}{d_p}} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$



Einfluss der Selektivität auf die Auflösung

ZIEL: $R = 1,5$



Erhöhung von α auf 105 %

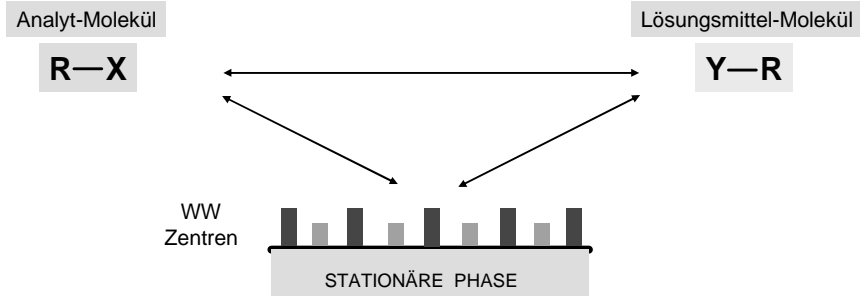
$N = 100\,000$	$\alpha = 1,02$	$k = 10$
$R = 0,25 \cdot 316 \cdot 0,020 \cdot 0,9 = 1,5$		

$N = 10\,000$	$\alpha = 1,07$	$k = 10$
$R = 0,25 \cdot 100 \cdot 0,065 \cdot 0,9 = 1,5$		

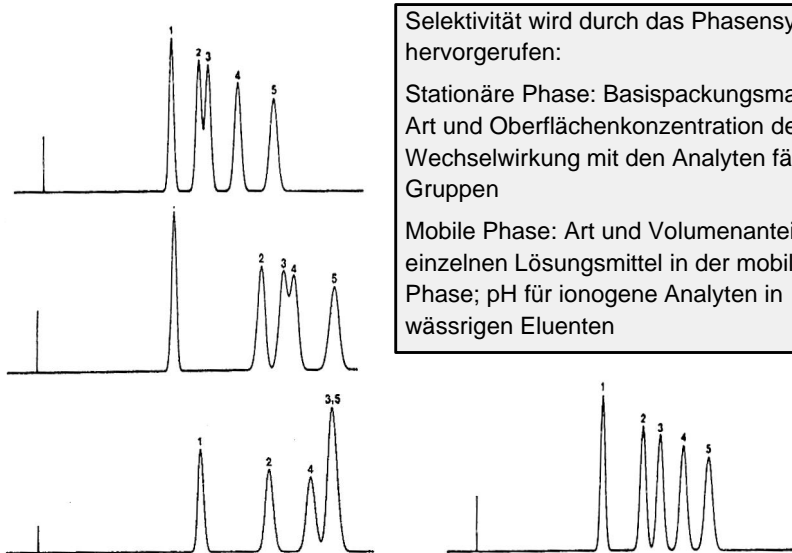
Erhöhung von $\frac{\alpha - 1}{\alpha}$ auf 325 % !

Chromatographie mit flüssiger mobiler Phase

Trennung durch unterschiedliche Wechselwirkungen



Trennung durch Selektivitätsveränderung



Selektivität wird durch das Phasensystem hervorgerufen:

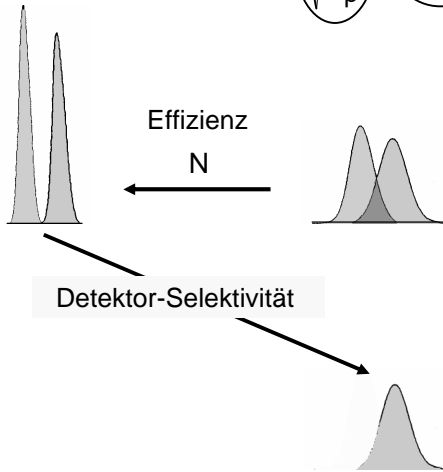
Stationäre Phase: Basispackungsmaterial, Art und Oberflächenkonzentration der zu Wechselwirkung mit den Analyten fähigen Gruppen

Mobile Phase: Art und Volumenanteil der einzelnen Lösungsmittel in der mobilen Phase; pH für ionogene Analyten in wässrigen Eluenten

Quelle: Drouen et al. in P.J.Schoenmakers (Ed.), Optimization of Chromatographic Selectivity, J. Chrom. Library, 35 (1986)

Verbesserung der Auflösung durch Verringerung der Dispersion
(Verbesserung der Effizienz/Erhöhung der Bodenzahl)

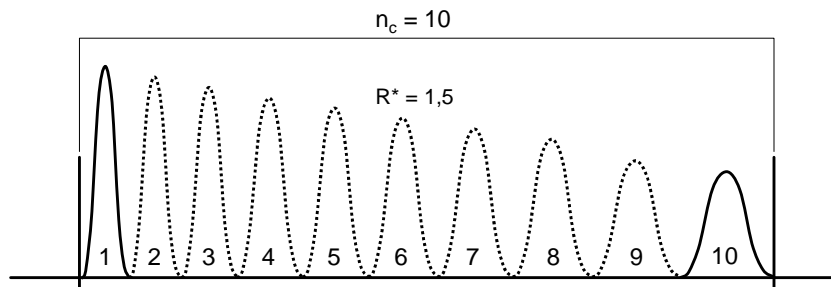
$$R = \frac{1}{4} \left(\sqrt{\frac{L}{d_p}} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$



© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Peakkapazität

Die Peakkapazität n_c gibt die Zahl der Peaks an, die mit einer bestimmten Auflösung in einem bestimmten Retentionszeitfenster getrennt werden können



$$n_c = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln(1 + k_{\max})$$

(GIDDINGS)

$$ZMP = \frac{t_{R10} - t_{R1}}{w_{10} - w_1} \cdot \ln \frac{w_{10}}{w_1}$$

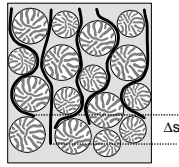
(STRUPPE)

V. Meyer, T. Welsch, LC-GC International 1996, 10, 670-681

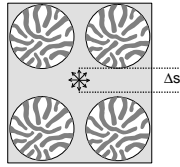
© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Abhängigkeit der Peakverbreiterung (theoretische Bodenhöhe) von Diffusionsvorgängen und der Fließgeschwindigkeit (Van Deemter Beziehung)

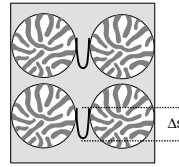
© PROF. THOMAS WELSCH · LEIPZIG · 2012



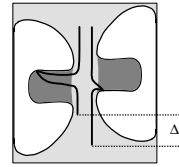
EDDY-DIFFUSION



LONGITUDINAL-DIFFUSION



LATERAL-DIFFUSION



POREN-DIFFUSION

Säule: $L = 150 \text{ mm}$, i.D.: 4 mm ; Partikeldurchmesser $d_p = 5 \text{ }\mu\text{m}$; Porosität $\epsilon = 0,8$; Packungsqualität: $\lambda = 1$; $\gamma = 0,5$; Fluss = $1,0 \text{ mL/min}$; Diffusionskoeffizient $D_m = 1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$; Retentionsfaktor $k = 10$

$$H = 10 \text{ }\mu\text{m} + 1 \text{ }\mu\text{m} + 4 \text{ }\mu\text{m}$$

$$H = 2\lambda \cdot d_p + \frac{2\gamma \cdot D_m}{u} + f(k) \cdot \frac{d_p^2}{D_m} \cdot u$$

Formeln zur Abschätzung der Effizienz und der erforderlichen Säulenlänge

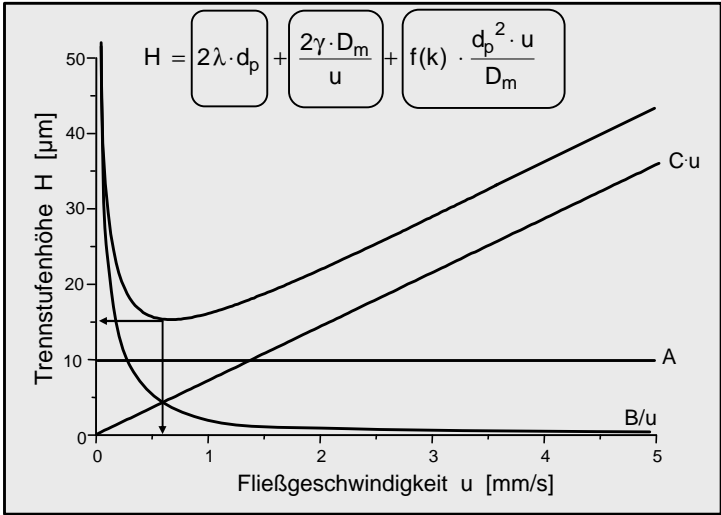
$$N \approx 3000 \frac{\text{(cm)}}{d_p \text{ (}\mu\text{m)}} L$$

$$L \approx 3 \frac{\text{(cm)}}{d_p \text{ (}\mu\text{m)}}$$

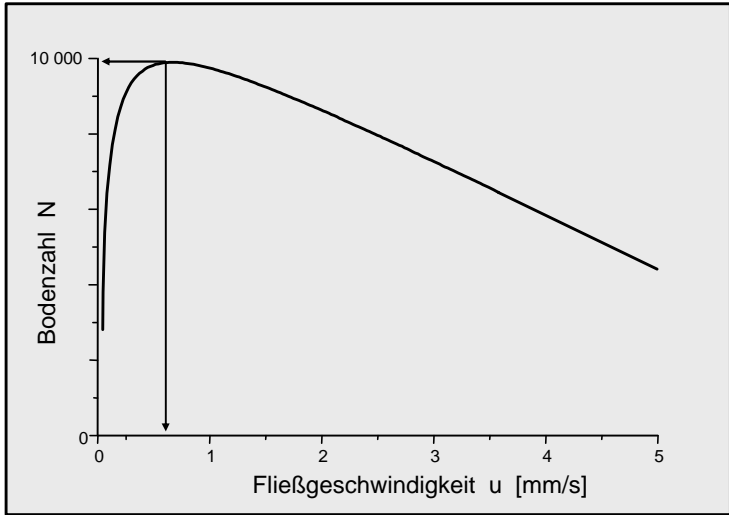
(für ca. 10 000 th. Böden)

© PROF. THOMAS WELSCH · LEIPZIG · 2012









Van Deemter Plot



Boden- oder Trennstufenzahl vs. Fließgeschwindigkeit

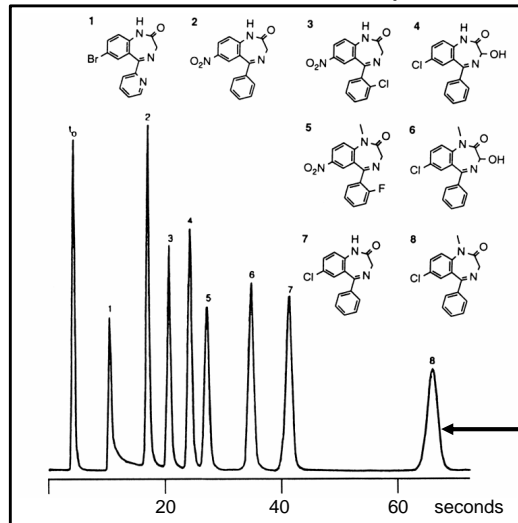


Entwicklung der Partikelgröße und Geometrie

Partikel - Durchmesser	Partikel - Form	Bodenzahl bei 10 cm Säulenlänge	Jahr
100 µm irregulär	porös 	100	1950's
35 µm pellicular		800	1967
10 µm irregulär sphärisch	porös 	4 000	1968
5 µm sphärisch	porös 	8 000	1985
3 µm sphärisch	porös 	10 000	1992
1,5 µm sphärisch	unporös 	20 000	1995
5 µm poroshell		8 000	1999
U H P L C			
1,7 – 2,2 µm sphärisch	porös *	16 000	2003
2 - 3 µm poroshell		15 000	2005

© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Schnelle Trennung von Benzodiazepinen an unporösen 1,5 µm Partikeln



Säule: 30 x 4,6 mm, ChromSphere UOP C18, 1,5 µm, Spez.OF: 2 m²/g
 Mobile Phase: ACN/H₂O: 15/85 (v/v)
 Fluss: 3,5 mL/min, Druck: 550 bar
 Injektionsvolumen: 1µL
 Detektion: UV, 254 nm,
 Zellvolumen: 1µL

N = 6000, H = 5 µm, h = 3.3
 φ = 650, E = 7000

T. Welsch, N. Lammers, G. Mayr „Reduction of Analysis Time in LC“ in E. Kaiser, H. Gunz, W. Günther (Eds.) Chromatography, InCom, Duesseldorf 1997, p 349-358
 Veronika R. Meyer, Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Salle Sauerländer, Aarau Frankfurt Salzburg 1999, S. 4

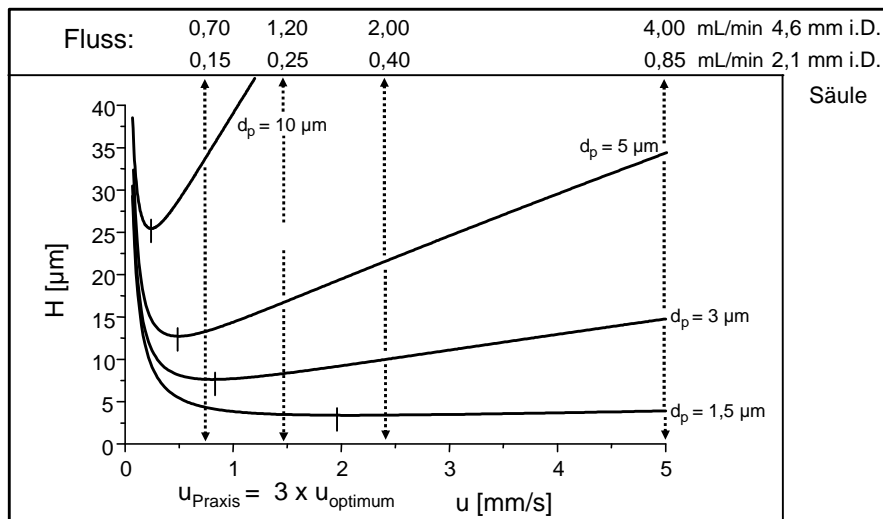
© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Ultra High Performance Liquid Chromatography behauptete Merkmale

- ➔ Ultra schnell / maximaler Probedurchsatz / geringe Cycluzzeiten
= 30 Sekunden
- ➔ Hohe Effizienz / Hohe Auflösung
= 60 000 plates
- ➔ Sehr schnell, dabei höhere Auflösung
- ➔ Höhere Empfindlichkeit
- ➔ Geringer Eluentenverbrauch
- ➔ Hohe Produktivität

© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Kleine Bodenhöhe und hohe Eluentengeschwindigkeit durch kleine Partikel



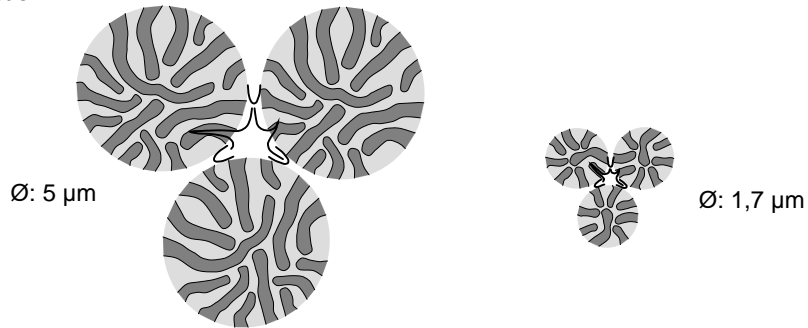
$$H = \left[A \cdot u^{1/3} + \frac{B}{u} + C \cdot u \right] d_p, \quad A = 1, B = 2, C = 0.144 \quad (k = 5), D_m = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}, \eta = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$$

G. Mayr, T. Welsch, J. Chromatogr. A 845 (1999) 155

© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

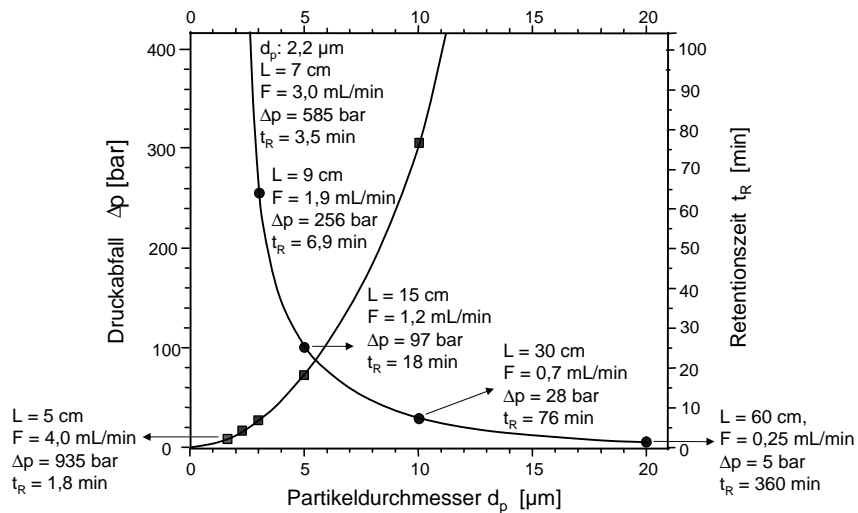
Konsequenzen bei der Verwendung kleiner Partikel

Mit Verkleinerung der Partikel verbessert sich die Bodenhöhe, die Auflösung bei gleicher Säulenlänge und die Analysengeschwindigkeit aber ...



$$H \propto d_p \quad N \propto \frac{L}{H} \quad t_R \propto \frac{L}{F} \quad \Delta p \propto L \quad \Delta p \propto \frac{1}{d_p^2}$$

Zusammenhang zwischen Partikeldurchmesser d_p , Druckabfall Δp und Analysenzeit t_R

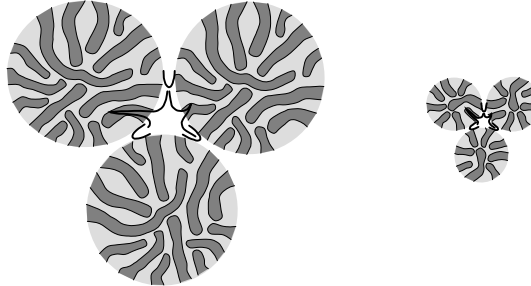


Parameter: $N = 10\,000$, $k = 10$, $d_c = 4,6\text{ mm}$, $F = F$ für $3 \times u_{\text{opt}}$, $D_m = 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$,
 $\eta = 1\text{ mPa s}$, $\varepsilon = 0,8$

Auswirkungen der Partikel-Verkleinerung

Ø: 5 µm

Ø: 1,7 µm



© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Säulenlänge für N = 10 000:	15 cm	5 cm
Fließgeschwindigkeit $u = 3 \times u_{opt}$:	1,5 mm/s	5,0 mm/s
Flussrate für 4,6 mm i.D. Säule:	1,2 mL/min	4,0 mL/min
Flussrate für 2,1 mm i.D. Säule:	0,25 mL/min	0,85 mL/min
Eingangsdruck ($\epsilon = 0,8, \eta = 1$):	97 bar	935 bar
Retentionszeit für Peak mit $k = 15$:	26 min	2,7 min
Eluentenverbrauch pro Lauf:	6,4 mL (2,1 mm i.D. Säule)	2,3 mL (2,1 mm i.D. Säule)

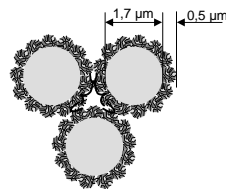
Verwendung von "Poroshell" Partikeln alternativ zu voll porösen Partikeln im 1,5 – 2,4 µm Bereich

Poroshell Partikel

Voll poröse Partikel

Ø: 2,7 µm

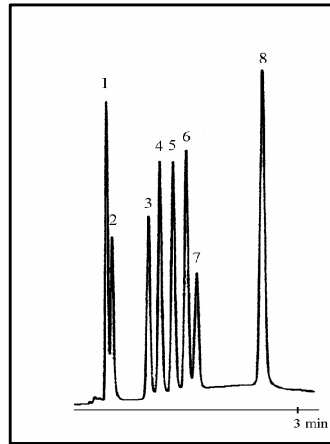
Ø: 1,7 µm



© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Säulenlänge für N = 10 000:	7,5 cm	5 cm
Fließgeschwindigkeit $u = 3 \times u_{opt}$:	3,8 mm/s	5,0 mm/s
Flussrate für 2,1 mm i.D. Säule:	0,43 mL/min	0,85 mL/min
Eingangsdruck ($\epsilon = 0,5/0,8, \eta = 1$):	363 bar	935 bar
Retentionszeit für Peak mit $k = 15$:	5,2 min	2,7 min
Eluentenverbrauch pro Lauf:	2,2 mL	2,3 mL
Merkmale:	+ Sehr gute Stoffaustauschkinetik, auch für größere Moleküle, „moderater“ Druck - geringere Probekapazität	+ Hoher Probedurchsatz, größere Probekapazität - Höchster Druck

Gradient-Separation of hormones on 1.5 µm particles



Substance:	1
1	Prednison
2	Hydrocortison
3	19-Nortestosteron
4	1-Dehydro-17α-methyltestosteron
5	Testosteron
6	17α-Methyltestosteron
7	Ethisteron
8	Progesteron

Column: SS, 30 x 4.6 mm ChromSphere UOP C18, 1.5 µm; Gradient: 0-3 min H₂O : MeOH , 75 : 25 (v/v) to 100 % MeOH; Flow rate: 2.7 mL/min; Initial Pressure: 530 bar; Temp.: 40°C; Detection: UV, 254 nm, cell volume 1 µL, data sampling rate 60 Hz

T. Welsch, N. Lammers, G. Mayr „Reduction of Analysis Time in LC“ in E. Kaiser, H. Gunz, W. Günther (Eds.) Chromatography, InCom, Duesseldorf 1997, p 349-358

Performance-Test von 4 Säulen (dp: 10 µm, dp: 5 µm, dp: 3 µm; dp: 2 µm) mittels isokratischer Trennung eines Gemisches von 18 Komponenten

Säulen: Silica-C18, 12 nm: 25 cm x 4,6 mm, dp: 10 µm; 15 cm x 4,6 mm, dp: 5 µm; 10 cm x 3 mm, dp: 3 µm; 5 cm x 2 mm, dp: 2 µm

Mobile Phase: H₂O : ACN, 52 : 48 (v/v), Viskosität bei 35°C ca. 0,68 mPa s

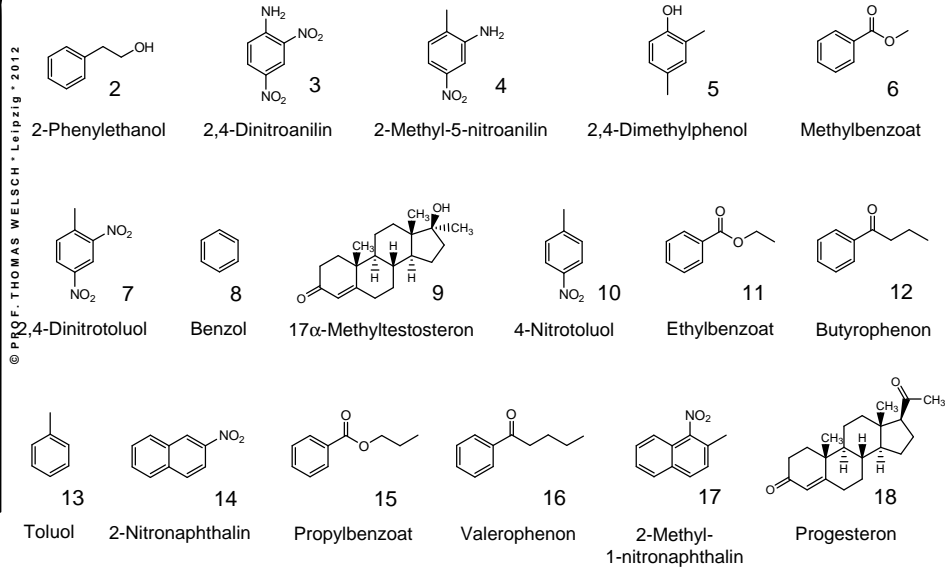
Temperatur 35°C (Umluftsäulenthermostat), Eluent vorgewärmt durch statischen Mischer und Edelstahlkapillare, 1 m x 0,5 mm i.D. (200 µL) vor Dosierventil

Detektion für 10 µm, 5 µm und 3 µm Säule: UV, 254 nm, Zellvolumen: 16 µL, Detektion für 2 µm Säule: UV, 254 nm, Zellvolumen 3 µL

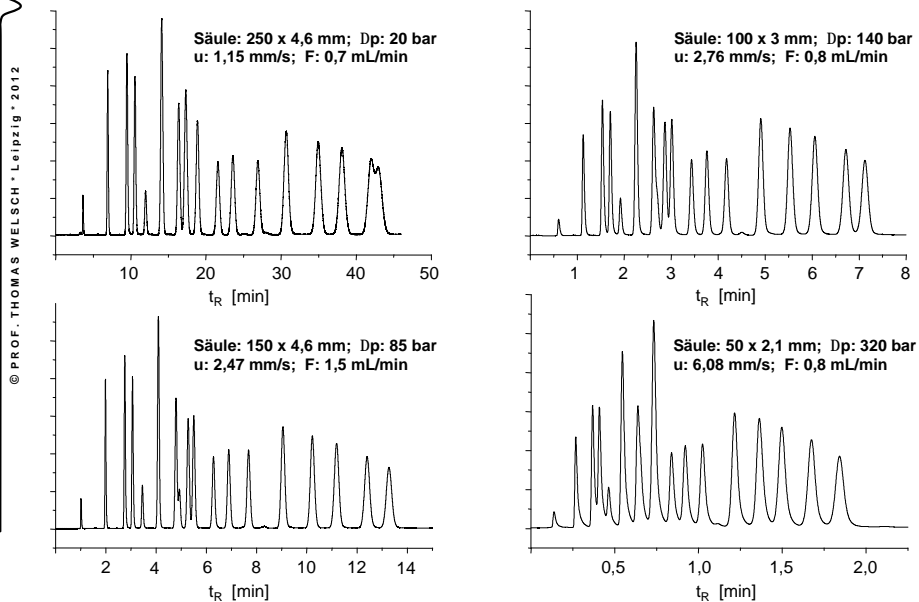
Injektionsvolumen für 10 µm, 5 µm und 3 µm Säule: 5 µL, Verbindungskapillaren Injektor-Säule: Edelstahl, 5 cm x 0,25 mm i.D., Säule-Detektor: PEEK, 28 cm x 0,17 mm i.D.

Injektionsvolumen für 2 µm Säule: 1 µL, Verbindungskapillaren Injektor-Säule: Edelstahl, 10 cm x 0,125 mm i.D., Säule-Detektor: PEEK, 17 cm x 0,125 mm i.D.

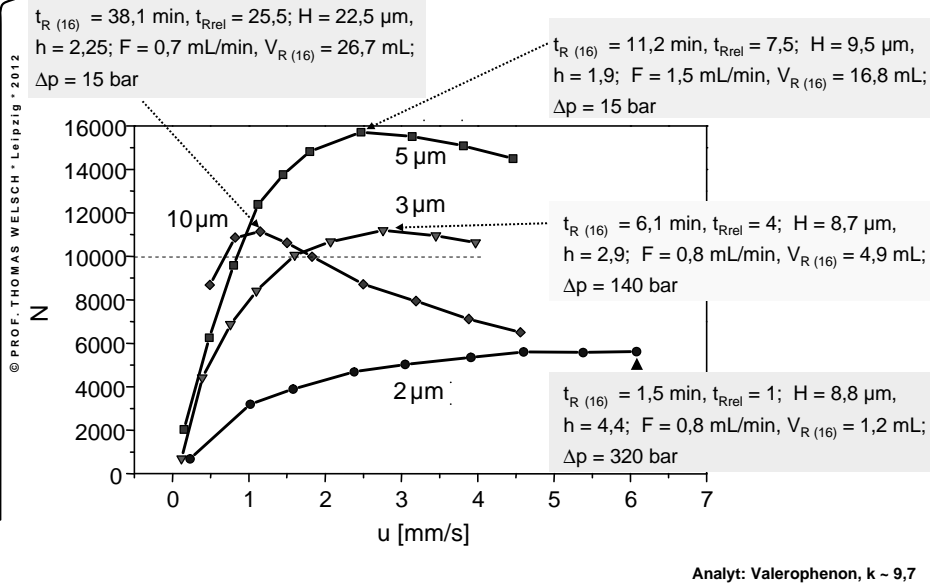
Testgemisch für die RP Chromatographie



Chromatogramme des RP-Testgemisches auf mit 10 μ m, 5 μ m, 3 μ m und 2 μ m Partikeln gepackten Säulen



Bodenzahl N vs. Fließgeschwindigkeit u für 4 Säulen



Bei der Ultra High Performance Liquid Chromatography besonders zu beachten:

- © PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012
- Strenge Gerätehygiene
Minimierung von Totvolumina
 - Physikalische Effekte bei der Gradientenformung (Niederdruck-, Hochdruck-); Unterschiedliche Dwell-Volumina verschiedener Geräte / Gerätekonfigurationen
 - Reibungswärmeeffekte in der Säule
Abhängigkeit der Retention / Peakform von der Art der Säulenthermostatisierung
 - Abhängigkeit der Retention vom Druck
 - Anpassung der Injektions- und Detektionsvolumina
 - Höhere Datenrate (= 60 Hz)

Erzielung sehr hoher Trennstufenzahlen (hohe Auflösung / Peakkapazität) zur Trennung komplexer Gemische durch serielle Säulenkopplung

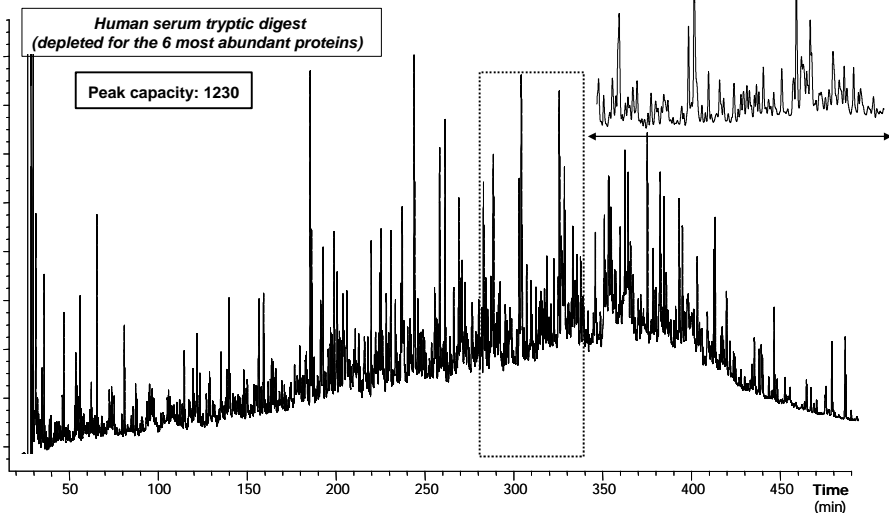
© PROF. THOMAS WELSCH - Leipzig - 2012

dp [μm]	h	H [μm]	L [cm]	N	F [mL/min]	Dp [bar]	t _R [min] ¹⁾
5	2,5	13	15	12 000	0,2	31	11
2,5	3,2	8	10	12 000	0,4	166	4
1,7	3,4	6	7,5	12 000	0,6	404	2
Serielle Kopplung von 8 Säulen:							
5	2,5	13	120	100 000	0,2	248	88
2,5	3,2	8	80	100 000	0,4	1330	32
1,7	3,4	6	60	100 000	0,6	3230	16

Einzelssäulen: dp = 5 μm , L = 150 mm x 2,1 mm; Porosität $\epsilon = 0.7$; Packungsqualität $\lambda = 0,8$; $\gamma = 0.5$;
 dp = 2,5 μm , L = 100 mm x 2,1 mm; Porosität $\epsilon = 0.7$; Packungsqualität $\lambda = 1,0$; $\gamma = 0.5$;
 dp = 1,7 μm , L = 75 mm x 2,1 mm; Porosität $\epsilon = 0.7$; Packungsqualität $\lambda = 1,2$; $\gamma = 0.5$;
 Retentionsfaktor k: 5; Säulentemperatur: 60°C; Eluentenviskosität: 0,4 mPa s;

High peak capacity 1D-HPLC

Courtesy of Prof. P. Sandra, RIC, Kortrijk, Belgium



8 x 25 cm (2 m) x 2.1 mm i.D. Columns Zorbax SB300-C18, 5 μm ; Mobile Phase: H₂O/ACN, Gradient;
 Flow rate: 0.2 mL/min, u = 1.5 mm/s; Pressure: 600-400 bar; Temperatur: 60°C; Detection: UV, 210 nm

K. Sandra et al. *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 241

Ultra High Performance Liquid Chromatography

- ➔ Ultra schnell ✓ / maximaler Probedurchsatz ✓ / geringe Cycluzzeiten ✓
= 30 Sekunden
- ➔ Hohe Effizienz 😞 / Hohe Auflösung 😞
= 60 000 plates
- ➔ Sehr schnell, dabei höhere Auflösung 😞
- ➔ Höhere Empfindlichkeit ✓ nur bei begrenztem Probevolumen
- ➔ Geringer Eluentenverbrauch ✓
- ➔ Hohe Produktivität ✓
- ➔ Hohe Robustheit der Methode / des Analysenverfahrens 😞
- ➔ Moderate Betriebsparameter 😞
- ➔ Geringe Kosten ✓

© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012

Fazit:

- ➔ Es ist nach wie vor zu entscheiden, ob bei der Entwicklung einer HPLC-Methode der Schwerpunkt bei hoher Auflösung (hohe Peakkapazität) oder bei kurzer Analysenzeit / hohem Probedurchsatz liegt oder Auflösung durch Kopplung der LC mit der Massenspektrometrie substituiert wird.
- ➔ Hohe Auflösung (hohe Peakkapazität) lässt sich bei akzeptablen Betriebsbedingungen mit langen Säulen und größeren Partikeln (= 5 µm) unter Einsatz von Zeit erzielen.
- ➔ Kurze Analysenzeit (hoher Probedurchsatz) lässt sich mit kurzen Säulen und kleinen Partikeln unter Einsatz von Druck erzielen.
- ➔ Die neueste Gerätegeneration der bekannten Hersteller ist für die verschiedenen HPLC-Methoden in gleicher Weise geeignet.
- ➔ Bei der schnellen HPLC spielt eine hohe „Gerätehygiene“ und die „richtige“ Thermostatisierung des Eluenten/ der Säule eine wichtige Rolle.
- ➔ Die Robustheit einer HPLC Methode scheint mit größeren Partikeln größer zu sein als mit kleinen Partikeln.

© PROF. THOMAS WELSCH · Leipzig · 2012