

Anforderungen an UHPLC Instrumente bei der Methodenentwicklung in der UHPLC und beim Methodentransfer von der konventionellen zur UHPLC

Autoren:

Dr. Davy Guillarme
Prof. Jean-Luc Veuthey

Analytisches Labor der pharmazeutischen Chemie
Schule für Pharmazeutischen Wissenschaften
Universität Genf
Universität Lausanne
Boulevard d'Yvoy 20
1211 Genf 4
Schweiz

Teilen Sie Ihre Erfahrung im produktionssteigerndem Methodentransfer HPLC-zu-UHPLC mit

Einführung

In den letzten Jahren war die Beschleunigung und/oder Verbesserung der Auflösung bei analytischen flüssigchromatographischen Trennungen, insbesondere durch die Entwicklung von Säulen mit porösen sub-2 µm Partikeln für die UHPLC (Ultra HPLC), von besonderem Interesse. Viele Laboratorien wollten ihre konventionellen HPLC-Methoden auf die schnellen UHPLC-Methoden übertragen, scheiterten aber mangels Erfahrung. In diesem Übersichtsartikel teilen wir unsere Erfahrung im HPLC-zu-UHPLC-Methodentransfer in Form einer einführenden Kurzanleitung mit, um denen zu helfen, die die neue und vielversprechende UHPLC-Methodik verwenden wollen, um ihre Produktivität zu erhöhen. PerkinElmer bietet Ihnen ein kostenloses Excel-Arbeitsblatt an, mit dem Sie einfach und effizient alle notwendigen Berechnungen durchführen und als Bericht ausdrucken können.

Fortschritte im Durchsatz und in der Auflösung in der Flüssigchromatographie

In der Flüssigchromatographie ist hinreichend bekannt, dass die Verwendung von kleineren Säulenpartikeln sowohl in einer größeren Anzahl von Trennböden als auch in einer schnelleren Trennung resultiert. Diese Effekte sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass i) die chromatographische Effizienz N direkt proportional zum Verhältnis von Säulenzlänge und Teilchendurchmesser L/d_p und ii) die Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase u umgekehrt proportional zum Teilchendurchmesser d_p ist. Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist es tatsächlich für schnelle Trennungen möglich, eine vergleichbare Effizienz zwischen einer 150 mm Säule mit 5 μm Partikeln und einer 50 mm Säule mit sub-2 μm Partikeln bei gleichzeitiger 9facher Reduktion der Analysenzeit zu erhalten.

Es ist theoretisch auch möglich, die gleiche Analysenzeit zwischen einer konventionellen HPLC-Säule und einer 450 mm Säule mit sub-2 μm Packung zu erreichen, wobei die Effizienz jedoch um den Faktor 9 erhöht wird. Die Reduktion der Teilchengröße bewirkt jedoch einen hohen Rückdruck (>400 bar), der die Verwendung konventioneller HPLC-Geräte ausschließt. Um das ganze Potential von Säulen mit kleinen Teilchenpackungen auszuschöpfen, wird empfohlen, mit einem HPLC-System zu arbeiten, das Drucken von bis zu 600 oder sogar 1000 bar stand hält. Durch Vergleich der intrinsischen Leistung einer sub-2 μm Säulenpackung mit anderen bestehenden Techniken wie z.B. Monolithen, fused-core oder Hochtemperatur-Flüssigchromatographie mit konventioneller Teilchengröße, wird hier gezeigt, dass die UHPLC mit einem maximalen Druck von 1000 bar eine sehr reizvolle Strategie (d.h. der Ansatz mit der kürzesten Analysenzeit bei gegebener Effizienz) im Bereich zwischen 1000 und 80000 Trennböden ist. Nur der Ansatz mit Monolithen für Effizienzen höher als 80000 Trennböden zeigt eine höhere Leistungsfähigkeit als die UHPLC – wobei eine solche Effizienz zumeist jenseits der Anforderungen einer üblichen flüssigchromatographischen Analyse liegt.

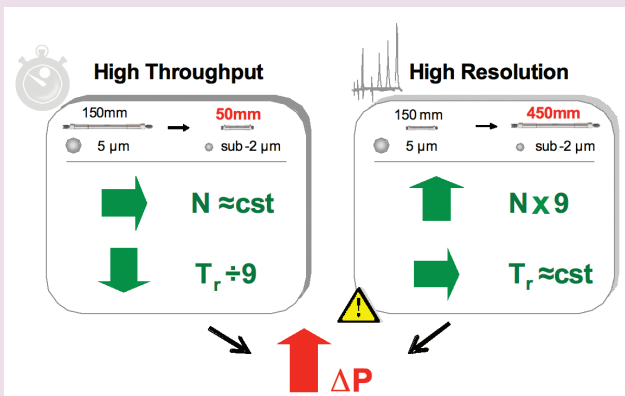


Abbildung 1: Mit sub-2 μm Partikeln gepackte Säule; Belange und Konzepte

Anforderungen für UHPLC-Untersuchungen

UHPLC-Geräte

Zur Arbeit mit Säulen, die kleine Teilchen enthalten, wird ein spezielles chromatographisches System benötigt. Zunächst einmal sollte dieses Instrument in der Lage sein, den durch die kleinen Teilchen hervorgerufenen sehr hohen Drücken stand zu halten, was im Allgemeinen durch erweiterte Druckbeständigkeit der Pumpe und des Probenaufgabesystems gewährleistet wird. Außerdem sollte das chromatographische System den schnellen und ultraschnellen Betriebsmodus unterstützen. Kleine Säulendurchmesser (1 und 2.1 mm I.D.) begrenzen die durch hohen Druck und hohe Flussraten bedingte Reibungswärme und verringern den Lösungsmittelverbrauch, erfordern aber, dass nur Totvolumina (extra column volumes) durch die Detektorzelle, die Kapillaren und das Injektionsvolumen vorliegen (siehe Abbildung 2).

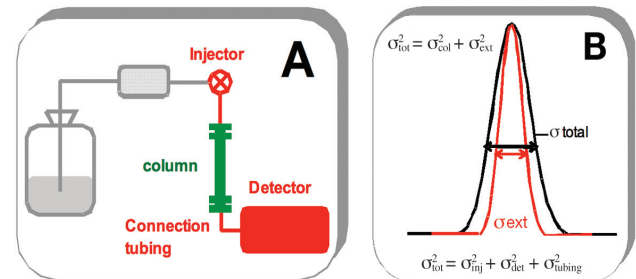


Abbildung 2: Die Zusammensetzung der Zusatzvolumina und die daraus resultierende Bandenverbreiterung

Folgendes Kriterium muss für eine effektive Trennung erfüllt werden: Das Kapillarvolumen sollte so weit wie möglich reduziert werden. Aus diesem Grund sollte die Kapillarlänge so kurz wie möglich und deren Durchmesser als Kompromiss zwischen noch akzeptablem Rückdruck und niedrigem Volumen gewählt werden. Deshalb werden Edelstahl-Kapillaren mit **0.005" bis 0.007"** und totvolumenfreie Verbinder im Allgemeinen für UHPLC-Untersuchungen verwendet. Das Injektionsvolumen sollte passend zur Säulengeometrie gewählt werden. Als Daumenregel sollte das Injektionsvolumen zwischen 1 und 5% des Säulentotvolumens betragen. Da die meisten Untersuchungen in der UHPLC mit 50x2.1 mm Säulen durchgeführt werden ($V_0 = 120 \mu\text{L}$), sollte das Injektionsvolumen etwa zwischen **1 und 5 μL** liegen, um die Bandenverbreiterung zu begrenzen. Zusätzlich ist eine kurze Injektionszykluszeit von weniger als einer oder zwei Minuten zwingend erforderlich. Das Detektorzellvolumen, die Zeitkonstante des Detektors und die Datenaufnahmerate sollten sorgfältig ausgewählt werden.

Der in der UHPLC verwendete Detektor sollte idealerweise ein geringes Zellvolumen besitzen (**2-3 μL oder niedriger**), wohingegen die Empfindlichkeit gegenüber den konventionellen HPLC-Geräten nicht verringert werden darf. Die Detektor-Zeitkonstante muss klein genug sein (**$\leq 100 \text{ ms}$**), weil die Peakbreiten in der UHPLC sehr schmal sind (nur wenige

Sekunden). Schließlich muss auch die Detektorsammelrate ausreichend hoch sein, um eine ausreichende Anzahl von Datenpunkten zur Peakbeschreibung zu liefern

(>20 Hz). Bemerkenswerterweise werden in der UHPLC oft chromatographische Bedingungen mit hohen Retentionsfaktoren (**k mindestens gleich 3**) empfohlen (d.h. hohe σ_{col}^2 Werte bewirken einen niedrigen Einfluss von σ_{ext}^2), um den Einfluss von Zusatzvolumina und unakzeptablem Verlust von Effizienz zu vermeiden. Aufgrund der sehr geringen Säulentotzeit in der UHPLC (z.B. $t_0 = 0.20$ min für konventionelle UHPLC-Bedingungen mit 50×2.1 mm, $1.9 \mu\text{m}$ Säulen bei $600 \mu\text{L}/\text{min}$) wird ein hoher Retentionsfaktor der Analysenzeit nicht abträglich sein. Ein Retentionsfaktor von zum Beispiel 5 in der konventionellen HPLC führt zu einer Analysenzeit von 10 Minuten, wohingegen in der UHPLC dieser Vorgang nur 1 Minute in Anspruch nimmt. Der letzte kritische Parameter um ultraschnelle Trennungen im Gradientenmodus durchzuführen, ist das Totvolumen (Gradienten-Verweilvolumen) des Systems, welches der notwendigen Zeit entspricht, bis die Gradientenmischung den Säuleneingang erreicht. Um mit ultraschnellen Trennungen arbeiten zu können, ist ein kleines Gradienten-Verweilvolumen erforderlich. Mit großen Verweilvolumen werden schnelle Trennungen beeinträchtigt, weil eine isokratische Haltezeit zu Anfang des Gradienten entsteht, die zu möglichen Änderungen der Selektivität und zur Verlängerung der Analysenzeit beiträgt. Um die Kompatibilität der UHPLC-Instrumentierung mit einer gegebenen Säulengeometrie zu prüfen, wird empfohlen, das chromatographische System durch Bestimmung des Zusatzvolumens und des Verweilvolumens zu charakterisieren. Für optimale Kompatibilität mit ultraschnellen Trennungen, sollte das Zusatzvolumen kleiner als $20 \mu\text{L}$, das Verweilvolumen jedoch nicht größer als ein paar hundert μL sein.

Qualität der mobilen Phase und des Puffer

Außerdem ist die Größe der Fritten und Partikel deutlich kleiner als bei herkömmlichen HPLC-Packungen. Die Eingangsporengröße einer herkömmlichen HPLC-Säule liegt oft bei $2 \mu\text{m}$, wohingegen diese in der UHPLC bei nur $0.2 \mu\text{m}$ liegen kann (dieser Wert hängt sehr vom Hersteller ab). Kleine möglicherweise in der mobilen Phase vorkommende Partikel, welche konventionelle HPLC-Materialien nicht beeinflussen, können in der UHPLC-Konfiguration kritisch sein. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Abwesenheit von unlöslichen Partikeln im Lösungsmittel sicherzustellen. Somit sollten folgende Grundregeln bei der Präparation der mobilen Phase in der UHPLC eingehalten werden:

- Ausschließliche Verwendung von hochreinen organischen Lösungsmitteln (idealerweise durch eine $0.22 \mu\text{m}$ Membran filtriert) – es ist sogar möglich Acetonitril von verschiedenen Herstellern im UHPLC-Grade einzusetzen
- Verwendung hochreiner Salze zur Herstellung von Puffern
- Wasser sollte ultrarein sein und durch eine $0.22 \mu\text{m}$ Membran



filtriert werden (Milli-Q® System oder ähnlich hohe Qualität wird empfohlen)

- Auf mikrobielles Wachstum achten (insbesondere bei Verwendung von Phosphat-Puffern): immer frisch präparierte mobile Phasen verwenden
- Sorgfältig bei der Reinigung von Gläsern vorgehen und Glasflaschen niemals offen stehen um das mikrobielle Wachstum zu reduzieren, sollte das Gerät und die Säule idealerweise mit reinem organischen Lösungsmitteln (Acetonitril oder Methanol) gelagert werden.

UHPLC-Säulen

Um das mikrobielle Wachstum einzuschränken, sollte das chromatographische System und die Säulen idealerweise immer mit reinen organischen Lösemitteln gelagert werden (Methanol oder Acetonitril). Einer der Hauptkritikpunkte von frühen UHPLC-Anwendern war immer die reduzierte Lebensdauer von Säulenmaterial mit sub- $2 \mu\text{m}$ Partikeln, verglichen mit konventionellen Säulen. Tatsächlich sind UHPLC-Säulen immer hohen Drucken ausgesetzt, aber der Packungsdruck wurde proportional erhöht. In unserem Labor haben wir beobachtet, dass die Lebensdauer von UHPLC und konventionellen Säulen in etwa vergleichbar sind. Nichtsdestotrotz hängt die Säulenlebensdauer von der Anzahl der Injektionen, der Anzahl der durchgelaufenen Säulenvolumina oder der Verwendungszeit ab. Mit der letzten Generation von Säulen, die eine sub- $2 \mu\text{m}$ Packung besitzen, ist es möglich, zwischen 500 bis 2000 Injektionen durchzuführen. Solche Werte korrespondieren mit ungefähr 5000 bis 20000 durchlaufenen Säulenvolumina, was völlig vergleichbar mit den Daten von herkömmlichen HPLC-Säulen ist. Betrachtet man jedoch die entsprechende Messdauer, so ist diese verglichen mit der herkömmlichen HPLC signifikant verringert, aufgrund des wesentlich größeren Durchsatzes in der UHPLC. In einem Routinelabor beispielsweise dauert eine UHPLC-Analyse in 1 bis 5 Minuten, wobei 1000 Injektionen in einer sehr kurzen Zeit durchgeführt werden. Die Messintervalle gegenüber der konven-

tionellen Instrumentierung sind bei vergleichbarer Arbeitslast deutlich kürzer (10 fach). Zusätzlich sollte die Re-Equilibrierzeit bei UHPLC Gradienten drastisch gegenüber der regulären HPLC verkürzt sein, um die Anzahl der durchlaufenen Säulenvolumina zu reduzieren. Trotzdem ist die UHPLC vom Durchfluss betroffen, da ein sehr geringes Säulenvolumen in Verbindung mit der hohen Lineargeschwindigkeit die Säulenpackung beansprucht. Es ist deshalb nicht empfehlenswert, das System kontinuierlich pumpen zu lassen, ohne eine Analyse durchzuführen, weil dadurch die Lebensdauer der Säule rapide abnehmen kann (50 Säulenvolumen können in 10 Minuten durch die Säule gespült werden).

Methoden Entwicklung in der UHPLC

Die Regeln zur Entwicklung neuer Methoden in der UHPLC unterscheiden sich geringfügig von der Entwicklung konventioneller Methoden, weil der durch die kleinteilige Säulenpackung hervorgerufene Rückdruck limitierend wirkt.

Wahl der Säulendimensionen

Abhängig vom Anbieter ist es möglich, spezielle Säulen für die UHPLC mit Durchmessern von 1, 2.1 und 4.6 mm zu finden. Wie bereits besprochen, sind Säulen mit 4.6 mm I.D. von geringem Interesse, weil hier signifikante Reibungswärme durch den Fluss der mobilen Phase entsteht, was wiederum zu einer mangelhaften Reproduzierbarkeit und möglichen Schwierigkeiten beim Methodentransfer von der konventionellen HPLC führt. Zusätzlich wäre der Verbrauch von Lösungsmittel relativ hoch, da die Flussrate idealerweise im Bereich von 3-5 mL/min liegen sollte. Obwohl die Reibungswärme bei einer Säule mit 1 mm I.D. sehr gering ist, wird aufgrund der höheren Kompatibilität zu anderen Kapillaren und Verbindungen doch eher ein Innendurchmesser von 2.1 mm I.D. gewählt. Aufgrund dieser Aussagen, kann der Innendurchmesser von 2.1 mm als optimal für die UHPLC Anwendung erachtet werden. Bezüglich der Säulenlänge sollte die Auswahl in Hinsicht auf die erforderliche Effizienz (in isokratischem Betrieb) oder Peak-Kapazität (im Gradienten-Betrieb) erfolgen. Wichtig an dieser Stelle ist, dass es keine wirkliche Grenze für die Säulenlänge in der UHPLC gibt. Zahlreiche Anbieter schlagen 150 mm Säulen vor, die mit Hilfe von totvolumenfreien Verbindern in Serie geschaltet werden können, wenn eine Untersuchung längere Säulen erfordert. Im isokratischen Betrieb kann man von den grundlegenden Berechnungen in der Chromatographie ableiten, dass die Effizienz direkt proportional zur Säulenlänge ist. Daher sollte eine Säule mit 50x2.1 mm, 1.9 µm ungefähr 10000 Trennböden haben, wohingegen die Effizienz auf 20000 oder 30000 Trennböden mit einer 100 oder 150x2.1 mm, 1.9 µm Säule ansteigt. Die Säulenlänge sollte also entsprechend der Trennanforderungen ausgewählt werden und die längste Säule liefert auch stets die höchste Effizienz. Bei 150 mm oder längeren Säulen jedoch sollte die Flussrate der mobilen Phase im Hinblick

auf den entstehenden Rückdruck angepasst werden, um das Gerät nicht zu überlasten. Im Gradienten-Betrieb ist die Beziehung zwischen Säulenlänge und chromatographischer Leistung (ausgedrückt durch die Peak Kapazität) nicht trivial. Tatsächlich hängt die Peak Kapazität sowohl von der Effizienz als auch von der Säulentotzeit in unterschiedlichem Maße ab. Die Säulenlänge sollte entsprechend passend zur Gradientenzeit gewählt werden und die längste Säule liefert nicht zwangsläufig die höchste Peak-Kapazität. Es kann beispielhaft gezeigt werden, dass eine 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule für Gradientenzeiten kleiner als 5 Minuten gewählt werden muss. Die 100x2.1 mm, 1.9 µm Säule zeigt optimale Leistung für Gradientenzeiten zwischen 5 und 20 Minuten und die 150x2.1 mm, 1.9 µm Säule schließlich sollte nur bei Gradienten länger als 20 Minuten gewählt werden.

Wahl der Bedingungen für die mobile Phase

In der UHPLC ist die Flussrate entsprechend zur Van Deemter-Kurve zu wählen (ähnlich der konventionellen HPLC), aber auch unter Berücksichtigung des entstehenden Rückdrucks. Für Komponenten im Molekulargewichtsbereich zwischen 100-400 g^{*}mol⁻¹, liegt die optimale Flussrate im isokratischen Betrieb für eine 2.1 mm I.D. Säule mit 1.9 µm Partikeln bei 400-600 µL/min. Aufgrund des geringen Massentransports, herbeigeführt durch die kleinen Packungsteilchen (reduzierter Diffusionsweg), ist es möglich, im Bereich bis 1000 µL/min unter nur geringem Effizienzverlust zu arbeiten (um 20%). Bei größeren Molekülen sollte die Flussrate der mobilen Phase wegen der verringerten Diffusionskoeffizienten auf 200-400 µL/min begrenzt werden. Die Regeln für den Gradientenmodus sind andere, wobei die höchste Fließgeschwindigkeit stets die beste Peak-Kapazität liefert, weil die Peak-Kapazität von der Säulentotzeit abhängt und – in geringerem Maße – auch von der Effizienz. Deshalb sollten die Flussraten für die UHPLC- Untersuchungen mit Gradienten auf 80-90% des maximalen Drucks, dem das Gerät noch standhält, erhöht werden. Diese Lösung wird empfohlen, um einen ausreichenden Grad an Robustheit zu erreichen und um unerwartete Änderungen im Säulenrückdruck nach Hunderten von Injektionen handhaben zu können. Bezüglich der Temperatur der mobilen Phase kann es günstig sein, bei 40-50°C anstatt bei Raumtemperatur zu arbeiten. Durch diese Vorgehensweise wird die Viskosität der mobilen Phase herabgesetzt und der Rückdruck sinkt um 30% (bei 50 °C für eine mobile Phase aus Acetonitril-Wasser) ohne die chromatographische Leistung zu beeinflussen.

Letztlich ist bekannt, dass die Viskosität von Acetonitril-Wasser Mischungen im Mittel 1.5 bis 2 fach niedriger ist, als diejenige von Methanol-Wasser Gemischen. Im Falle von Methodenentwicklungen, sollte daher mit einer mobilen Phase aus Acetonitril begonnen werden, da mit dieser ein niedriger Rückdruck und damit vielfältigere Möglichkeiten für die UHPLC im Vergleich zum Methanol zur Verfügung stehen (insbesondere in Bezug auf die Säulenlänge).

Auswahlkriterien für die Methodenentwicklung

Auf Basis obenstehender Diskussion lassen sich generische/allgemeingültige Bedingungen für die UHPLC Methodenentwicklung aufstellen: Bei der Säulenauswahl sollte man von einer C18 Phase der Abmessung 50x2.1 mm, 1.9 µm betrieben bei einer Temperatur von 40-50 °C ausgehen. Die mobile Phase sollte aus einer Mischung von Acetonitril und Puffer bestehen. Es ist im Allgemeinen günstig die Untersuchungen im Gradientenmodus bei einer mobilen Flussrate nahe dem maximalen Rückdruck der jeweiligen Gerätehardware zu beginnen. Bezüglich der Auswahl der Gradientenzeit ist es sehr schwierig, die UHPLC mit der konventionellen HPLC zu vergleichen. In Tabelle 1 sind die optimalen Gradientenzeiten für verschiedene UHPLC-Bedingungen zusammengestellt. Wenn die Selektivität mit den zuvor beschriebenen allgemeinen Bedingungen nicht akzeptabel ist, lassen sich verschiedene Parameter anpassen (pH-Wert der mobilen Phase, Art der stationären Phase und organischer Eluent). In der UHPLC ist der erst zu ändernde Parameter der pH-Wert der mobilen Phase, dann die Art der verwendeten Säule und zuletzt die Art des verwendeten Eluenten (aufgrund der Druckbeschränkung in der UHPLC).

Methodentransfer in der UHPLC

In verschiedenen Anwendungsfeldern (d.h. im Pharma, Umwelt, Ernährung, etc.), ist es wichtig, existierende Methoden (der konventionellen HPLC-Arbeitsweise) hin zu schnelleren Trennungen übertragen zu können, unter Zuhilfenahme von mit sub-2 µm Partikeln gepackten Säulen. Da die meisten Anbieter jetzt äquivalente mit 5, 3 und sub-2 µm Partikeln verkaufen, kann ein geometrischer Transfer durchgeführt werden, wenn die Chemie der stationären Phase zwischen der ursprünglichen und der endgültigen Bedingung erhalten bleibt. Zu diesem Zweck sollten einige Regeln sowohl für den isokratischen als auch den Gradienten-Betrieb angewandt werden.

Der isokratische Fall

Im isokratischen Modus müssen zwei wichtige Parameter verän-

dert werden, nämlich das Injektionsvolumen und die Flussrate der mobilen Phase. Um unerwünschte Bandenverbreiterung durch Zusatzvolumina zu vermeiden und eine äquivalente Empfindlichkeit aufrecht zu erhalten, ist es notwendig das Injektionsvolumen an die Säulendimensionen anzupassen. In der Flüssigchromatographie sollte das Injektionsvolumen nur 1-5% des Säulenvolumens betragen. Das Säulenvolumen kann einfach aus dem Innendurchmesser und der Länge der Säule abgeschätzt werden. Damit ist das Injektionsvolumen unabhängig von der Partikelgröße der Säulenpackung und nur proportional zum Säulenvolumen. Das neue Injektionsvolumen kann einfach durch Beibehaltung des Verhältnisses von Totvolumen und Injektionsvolumen zwischen der konventionellen und der UHPLC bestimmt werden. Somit setzt sich das Injektionsvolumen in der UHPLC wie folgt zusammen:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (1)$$

In dieser Gleichung sind die Indizes 1 und 2 bezogen auf HPLC- und UHPLC-Säulendimensionen. Von einer konventionellen 150x4.6 mm, 5 µm Säule beispielsweise zu einer UHPLC 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule, sinkt das Injektionsvolumen um das 14 fache. Hervorzuheben ist, dass größere Injektionsvolumen als die voraus berechneten zur Erhöhung der Empfindlichkeit verwendet werden können. Die Probe sollte dazu jedoch in einem Lösemittel schwächerer Elutionskraft gelöst werden als die spätere Ausgangszusammensetzung der mobilen Phase. Dieser Ansatz wird als Probenfokussierung (Peak Kompression) beschrieben und erlaubt die Anreicherung des Analyten am Säulenkopf. Die Flussrate der mobilen Phase sollte dicht an den optimalen Wert aus der Van Deemter-Kurve angepasst werden ($H=f(u)$). In der Flüssigchromatographie ist bekannt, dass die Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase (u) direkt proportional zum Quadrat des Säulendurchmessers ist und es besteht auch eine Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser des Trägermaterials. Die Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase ist jedoch völlig unabhängig von der Säulenlänge.

Tabelle 1: Berechnete optimale Gradientenzeit entsprechend der Säulengeometrie

Säulengeometrie	Flussrate	Gradientenprofil	Optimale Gradientenzeit
150x4.6 mm, 5 µm	1 mL/min	5-95%	30 min
50x2.1 mm, 1.9 µm	600 µL/min	5-95%	3.5 min
50x2.1 mm, 1.9 µm	1 mL/min	5-95%	2.0 min
50x2.1 mm, 1.9 µm	600 µL/min	10-60%	2.0 min
100x2.1 mm, 1.9 µm	300 µL/min	5-95%	14 min
100x2.1 mm, 1.9 µm	300 µL/min	10-60%	8 min
150x2.1 mm, 1.9 µm	200 µL/min	5-95%	30 min
150x2.1 mm, 1.9 µm	200 µL/min	10-60%	17 min

Für einen erfolgreichen Methodentransfer ist es zwingend erforderlich, das Produkt aus $u \cdot d_p$ konstant zu halten, um gleichzeitigen Änderungen in Säulendurchmesser und Partikelgröße Rechnung zu tragen. Für eine geometrische Übertragung kann die UHPLC-Flussrate (F_2) nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}^2} \cdot \frac{d_p^2}{d_p^2} \quad (2)$$

Als Beispiel ausgehend von einer herkömmlichen 150x4.6 mm, 5 µm Säule zu einer UHPLC 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule, sollte der Fluss der mobilen Phase 1.8 fach reduziert werden. Die erwartete Analysenzeit der transferierten Methode (t_{ana_2}) ist direkt proportional zu der Änderung in der Säulentotzeit und kann folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$t_{ana_2} = t_{ana_1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (3)$$

Der erwartete Rückdruck (ΔP_2) kann aus Darcys Gesetz berechnet werden, welches einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen ΔP und dp^3 zeigt und strikt mit der Säulenlänge verknüpft ist:

$$\Delta P_2 = \Delta P_1 \cdot \frac{L_2}{L_1} \cdot \frac{d_{p_1}^3}{d_{p_2}^3} \quad (4)$$

Zuletzt kann der erwartete Lösungsmittelverbrauch der übertragenen Methode (V_2) berechnet werden, indem die Änderung des Säuleninnendurchmessers, die Partikelgröße und Analysenzeit berücksichtigt werden:

$$V_2 = V_1 \cdot \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}^2} \cdot \frac{d_{p_1}}{d_{p_2}} \cdot \frac{t_{ana_2}}{t_{ana_1}} \quad (5)$$

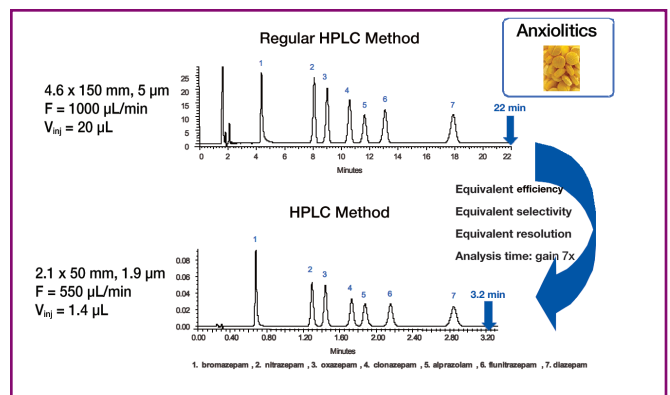


Abbildung 3: Isokratischer Methodentransfer von der herkömmlichen HPLC zur UHPLC

Ausgehend von einer herkömmlichen 150x4.6 mm, 5 µm Säule zu einer UHPLC 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule wird die Analysenzeit um das 8 fache reduziert. Es muss auch angemerkt werden, dass für den oben beschriebenen Übertragungsvorgang die Effizienz identisch erhalten bleibt, wohingegen der Rückdruck um den Faktor 6 erhöht und der Lösungsmittelverbrauch um das 14 fache reduziert wird. Hierdurch werden sowohl die Vorteile der Arbeitsweise der UHPLC demonstriert, aber auch, dass hierfür Geräte, die einem Druck von 400 bar standhalten, notwendig sind. Tabelle 2 fasst das Injektionsvolumen, die Flussraten der mobilen Phase, Analysenzeiten, Säulen Rückdrucke und Lösungsmittelverbrauch berechnet mit den Gleichungen 1 bis 5 für verschiedene typische Säulengeometrien zusammen. In der Literatur lässt sich möglicherweise eine ganze Anzahl von Anwendungen finden, die die Möglichkeit des Transfers von isokratischen HPLC-Methoden hin zu Säulen mit sub-2 µm Partikeln aufzeigen. Um der Klarheit willen wird nur ein Beispiel dargestellt, aber dieser Ansatz kann auf eine Vielzahl von Komponenten und Matrizen angewandt werden. Abbildung 3 stellt einen Methodentransfer von einer konventionellen 150x4.6 mm, 5 µm Säule zu einer 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule dar. Beide Säule liefern eine gleichwertige Effizienz von ungefähr 10000 Trennböden (ähnliches L/dp Verhältnis).

Tabelle 2. Optimale Bedingungen um mit 6 Säulengeometrien zu arbeiten, die eine ähnliche theoretische Effizienz von 10000 Trennböden aufweisen. Änderungen in der Analysenzeit, Rückdruck und Lösungsmittelverbrauch wurden ebenfalls angegeben.

Säulengeometrie	Injektionsvolumen	Flussrate der mobilen Phase	Änderung der Analysendauer	Änderung im Rückdruck	Änderung in der Lösungsmittelzusammensetzung
150x4.6 mm, 5 µm	20 µL	1.00 mL/min	–	–	–
100x4.6 mm, 3.5 µm	13.3 µL	1.43 mL/min	÷ 2.1	× 1.9	÷ 1.5
50x4.6 mm, 1.9 µm	6.7 µL	2.63 mL/min	÷ 7.9	× 6.1	÷ 3
150x2.1 mm, 5 µm	4.2 µL	0.21 mL/min	–	–	÷ 4.8
100x2.1 mm, 3.5 µm	2.8 µL	0.30 mL/min	÷ 2.1	× 1.9	÷ 7.2
50x2.1 mm, 1.9 µm	1.4 µL	0.55 mL/min	÷ 7.9	× 6.1	÷ 14.4

Wie in den Chromatogrammen gezeigt, bleiben Effizienz, Selektivität und Auflösung für die Trennung der sieben gebräuchlichen Anxyolitika (angstlösende Präparate) gleich. Nach Anpassung der Flussrate der mobile Phase konnte die Analysenzeit um das 7 fache gesenkt werden (22 gegenüber 3.2 Minuten), wie nach theoretischen Überlegungen bei einem Transfer von 5 auf 1.9 µm Partikel erwartet.

Fall des Gradientenmodus

Die Regeln für den Methodentransfer im Gradientenbetrieb sind weitaus komplexer als im isokratischen Betrieb basieren aber auf den gleichen grundlegenden Prinzipien der Chromatographie. Zunächst sollten das Injektionsvolumen und die Flussrate der mobilen Phase in ähnlicher Weise wie beim isokratischen Betrieb angepasst werden (siehe Gleichung 1 und 2). In linearer oder multilinearer Gradientenelution, kann das Gradientenprofil als Kombination von isokratischen und Gradientensegmenten zusammengesetzt werden. Die Regeln für den effizienten Gradienten-Transfer wurden ursprünglich von Snyder und Dolan (1) eingeführt und vor kurzem durch Carr et al (2) aktualisiert und sollten strikt befolgt werden. Für beide Teile ist es wichtig, das Gradientenvolumen in Größenverhältnis zu der Anzahl der Säulenvolumina anzupassen, um identische Elutionsmuster zu erhalten, wobei die ursprüngliche und endgültige Zusammensetzung konstant gehalten werden sollte. Tatsächlich sollte die Anzahl der Säulenvolumina, welche während eines Gradienten im herkömmlichen HPLC System die Säule durchströmen, äquivalent zu denen der UHPLC sein. Für jeden isokratischen Schritt innerhalb des Gradienten (d.h. isokratischer Ausgangsschritt, isokratischer Schritt während eines multilinearen Gradienten und auch die Reequilibrierzeit) sollte das Verhältnis zwischen der isokratischen Schrittzeit (t_{iso}) und der Säulentotzeit (welche von der Flussrate der mobilen Phase, dem Innendurchmesser der Säule und deren Länge abhängt) äquivalent zu den konventionellen HPLC- und UHPLC-Bedingungen gehalten werden. Demzufolge können die isokratischen UHPLC Schritte (t_{iso_2}) folgendermaßen bestimmt werden:

$$t_{iso_2} = t_{iso_1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{d_{c_2}^2}{d_{c_1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (6)$$

Beispielhaft ausgehend von einer herkömmlichen 150x4.6 mm, 5 µm Säule zu einer UHPLC 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule sollten die isokratischen Schritte, welche während des Gradientenprozesses auftreten, (inklusive der Reequilibrierzeit) um das 9 fache reduziert werden. Für Steigungen ist es zwingend erforderlich die ursprüngliche und endgültige Gradientenzusammensetzung (%B) konstant zu halten. Die neue Gradientenzeit (t_{grad_2}) kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$(t_{grad_2}) = \frac{(\%B_{final_1} - \%B_{initial_1})}{slope_2} \quad (7)$$

Die Gradientensteigung ($slope_2$) sollte so berechnet werden, dass das Produkt der Steigung und der Säulentotzeit konstant bleiben. Die neue Gradientensteigung ($slope_2$) kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$slope_2 = slope_1 \cdot \frac{d_{c_1}^2}{d_{c_2}^2} \cdot \frac{L_1}{L_2} \cdot \frac{F_2}{F_1} \quad (8)$$

Beispielhaft ausgehend von einer herkömmlichen 150x4.6 mm, 5 µm Säule zu einer UHPLC 50x2.1 mm, 1.9 µm Säule, sollte die Gradientensteigung während des Gradientenvorgang um den Faktor 8 erhöht werden. Wenn eine Gradientenmethode von der herkömmlichen HPLC zur UHPLC übertragen wird, können aufgrund der unterschiedlichen Gradienten-Verweilvolumina (dwell volume) zwischen der ursprünglichen und der UHPLC-Konfiguration Änderungen in der Selektivität auftreten. Das Gradienten-Verweilvolumen des Systems (dwell volume) (V_d) wird auch Gradient Delay Volume genannt. Es bezieht sich auf

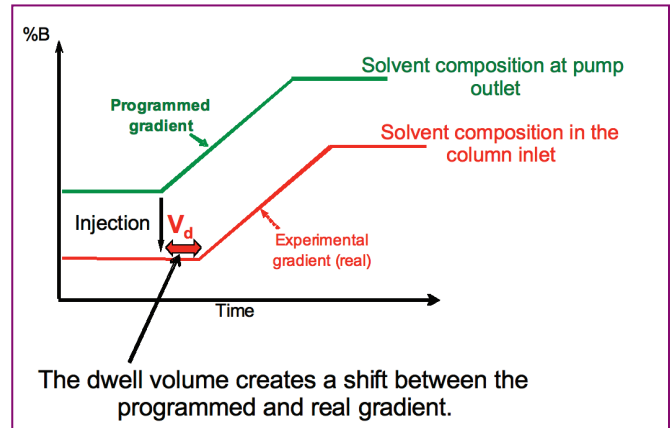


Abbildung 4: Bedeutung des Verweilvolumens beim Transfer von Gradientenmethoden

das Volumen zwischen dem Mischungspunkt der Lösungsmittel und dem Kopf der Säule, wie in Abbildung 4 gezeigt. Niederdruck-Systeme besitzen generell größere Gradienten-Verweilvolumen (dwell volumes) als Hochdrucksysteme. Nach dem Starten des Gradienten dauert es eine gewisse Zeit bis die ausgewählte Menge an Eluent die Säule erreicht. Das bedeutet, dass die Probe einer zusätzlichen isokratischen Migration unter den Ausgangsbedingungen unterworfen ist. Da das Gradienten-Verweilvolumen (dwell volume) sich von einem System zum anderen unterscheidet, würde dieser zusätzliche isokratische Schritt ebenfalls unterschiedlich sein und könnte in Retentionszeit-Schwankungen beim Methodentransfer münden, welche die Auflösung für früh eluierende Peaks beeinflussen. Um dieser Problematik zu begegnen, muss das Verhältnis der Gradienten-Verweilzeit (dwell time) (t_d) des Systems und der Säulentotzeit (t_0) bei Änderung der Säulendimensionen, Partikelgröße oder Flussrate konstant gehalten werden. Da die Säulentotzeit ungefähr 14 fache zwischen einer herkömmlichen 150x4.6 mm, 5 µm Säule und einer 50x2.1 mm, 1.9 µm

Säule **verkürzt wird**, sollte die Gradienten-Verweilzeit des Systems (system dwell time) in einer ähnlichen Größenordnung reduziert werden. Daher ist es in der UHPLC zwingend erforderlich mit einem System zu arbeiten, dessen Gradienten-Verweilvolumen (dwell volume) sehr gering ist (nicht mehr als ein paar hundert μL), um den Einfluss von V_d zu minimieren. Bleibt die Differenz zwischen den t_d/t_0 Verhältnissen zu groß, ist es auch möglich eine isokratische Haltezeit am Anfang des UHPLC-Gradienten zu platzieren. Die Anwendbarkeit dieses Ansatzes kann wiederum in der Literatur für den Methodentransfer zwischen herkömmlicher und sub-2 μm Packungen gefunden werden. Ein ausgewähltes Beispiel ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die Trennung von 12 pharmazeutischen Komponenten wurde ursprünglich mit Hilfe einer $150 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, C_{18} Säule durchgeführt und anschließend auf die UHPLC mit einer $50 \times 2.1 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$ C_{18} Säule mit strikt gleicher chemischer Zusammensetzung der stationären Phase übertragen. Die

ursprüngliche Trennung wurde in ungefähr 27 Minuten erreicht und sehr effizient auf die UHPLC in weniger als 3 Minuten angepasst (Reduktion um das 9fache). Außerdem sind beide Trennungen in Hinsicht auf die Empfindlichkeit, Peak-Kapazität und Auflösung äquivalent, hauptsächlich, weil mit der Übertragung eine angemessene Reduktion des Gradientenverweilvolumens (von 1.3 mL für HPLC auf $130 \mu\text{L}$ für UHPLC). Ein anderer bedeutender Vorteil der UHPLC ist die Zeitersparnis bei der Re-Equilibrierzeit. In der HPLC ($150 \times 4.6 \text{ mm}$ Säule bei 1 mL/min) dauert die Re-Equilibrierung ungefähr 20 Minuten, wohingegen bei Verwendung einer kurzen mit sub-2 μm Partikeln gepackten Säule ($50 \times 2.1 \text{ mm}$ Säule bei $600 \mu\text{L/min}$) die Re-Equilibrierzeit auf 2 Minuten sinkt. Eine letzte Empfehlung bei Verwendung zur Arbeit mit der UHPLC ist, sorgfältig bei der Erhöhung der Flussrate der mobilen Phase im Gradientenmodus vorzugehen. Für eine angemessene Übertragung ist es notwendig, das Gradientenprofil bei Steigerung der Flussrate, wie in Gleichung 6 und 8 beschrieben, anzupassen. Bei Änderung der Fließgeschwindigkeit muss die Gradientensteigung und die Zeit jeglicher isokratischer Schritte zur Erhaltung äquivalenter Selektivitäten entsprechend adaptiert werden. Gleichung 1 bis 8 können verwendet werden, um die neuen Parameter für eine zu übertragende isokratische oder Gradientenmethode zu bestimmen. An der Universität von Genf haben wir ein frei verfügbares Programm namens "HPLC calculator" auf unsere Internetseite gestellt <http://www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/divers/downloads.php>, welches die optimalen Bedingungen für den Methodentransfer im isokratischen und Gradienten-Modus berechnet. Innerhalb des Programms kann auch das Verweilvolumen zu Berechnungen im Gradientenbetrieb berücksichtigt werden.

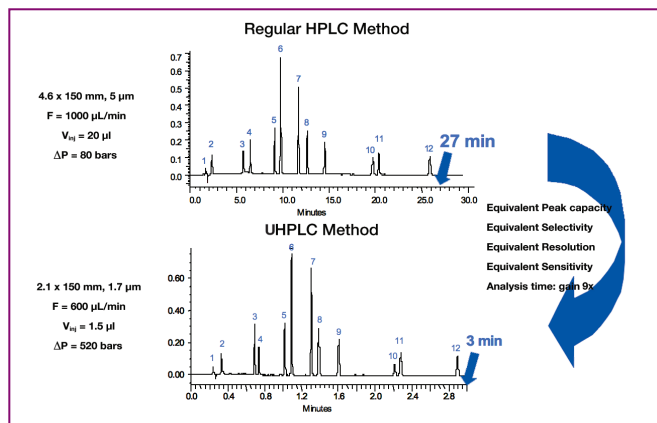


Abbildung 5: Methodentransfer von der HPLC zur UHPLC beim Gradientenmodus

References

1. J.W. Dolan, L.R. Snyder, Maintaining fixed band spacing when changing column dimensions in gradient elution, J. Chromatogr. A 799 (1998) 21-34
2. A.P. Schellinger, P.W. Carr, A practical approach to transferring linear gradient elution methods, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 110-119.

Abkürzungsverzeichnis

Symbole

d_e	Innendurchmesser der Säule
d_p	Partikelgröße der stationären Phase
F	Flussrate der mobilen Phase
k	Retentionsfaktor der Komponente
L	Säulenlänge
N	chromatographische Effizienz
Slope	Gradientensteigung
t_0	Säulentotzeit
t_{ana}	gesamte Analysendauer
t_d	Gradientenweilzeit (gradient dwell/delay time)

t_{iso}	ursprüngliche isokratische Haltezeit
t_{grad}	Gradientenzeit
u	Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase
V	Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase
V_0	Volumen des verbrauchten Lösungsmittels
V_{inj}	Injektionsvolumen

Greek symbols

ΔP :	Säulenrückdruck
σ_{ext}^2	Bandenverbreiterung außerhalb der Säule
σ_{col}^2	Bandenverbreiterung auf der Säule
τ	time constant of the detector
$\%B_{initial}$	ursprünglicher Anteil an organischem Eluenten
$\%B_{final}$	Endanteil organischer Eluent

Schlussfolgerung

Die UHPLC-Technologie (definiert als mit sub-2 µm Partikeln gepackte Säulen, die unter Hochdruck-Bedingungen verwandt werden) hat sich als leistungsfähiger Ansatz zur Verbesserung der chromatographischen Analyse in Bezug auf Probendurchsatz und Auflösung erwiesen. Durch den Vergleich seiner intrinsischen Leistungsfähigkeit mit anderen existierenden Techniken, so wie Monolithen oder der Hochtemperatur-Flüssigchromatographie, ist es ein sehr attraktiver Lösungsansatz zur Verbesserung der chromatographischen Effizienz im Bereich von 1000 bis 80000 Trennböden. Ein wichtiger Faktor, um eine passende Leistungsfähigkeit beim Einsatz von Säulen mit sub-2 µm Partikeln zu erhalten, ist die Wahl passender Gerätehardware. Tatsächlich ist es zwingend erforderlich ein Gerät zu verwenden, das Drucken oberhalb von 400 bar standhält. Das System sollte auch sehr geringe Zusatzvolumina, ein begrenztes Gradienten-Verweilvolumen (dwell volume) und eine ausreichende Datenaufnahmerate aufweisen. Die Regeln zur Methodenentwicklung in der UHPLC weichen geringfügig von denen in der herkömmlichen HPLC ab, weil der durch die kleinen Partikel hervorgerufene hohe Rückdruck miteinbezogen werden muss. Beispielsweise ist Acetonitril die erste Wahl für den organischen Anteil der mobilen Phase aufgrund der verglichen mit Methanol geringeren Viskosität. Darüberhinaus ist es immer vorteilhaft, bei Temperaturen geringfügig über der Raumtemperatur zu arbeiten (40-50 °C). Einer der Hauptvorteile der UHPLC stellt die Möglichkeit dar, auf einfache Art und Weise existierende HPLC-Methoden auf mit sub-2 µm Partikeln gepackte Säulen, unter Verwendung grundlegender chromatographischer Gleichungen, zu transferieren. Im isokratischen Modus müssen nur das Injektionsvolumen und die Flussrate angepasst werden. Im Falle des Gradientenmodus müssen das Injektionsvolumen, die Flussrate, die Dauer der isokratischen Schritte und die Steigung der Gradientenschritte angepasst und das Gradienten-Verweilvolumen (dwell volume) sorgfältig kontrolliert werden.

Wissenswertes zu den Autoren

Dr. Davy Guillarme und Prof. Jean-Luc Veuthey gehören zum Stab des Laboratoriums der analytischen pharmazeutischen Chemie (LCAP) der Universität Genf, Universität Lausanne in der Schweiz. Sie beschäftigen sich hauptsächlich mit der Entwicklung von flüssigchromatographischen (LC) Methoden für die Analyse sowohl von Wirkstoffen und Metaboliten in pharmazeutischen Rezepturen als auch in biologischen Matrizen. Das LCAP, geführt von Prof. Jean-Luc Veuthey, war eines der ersten Laboratorien, welches mit der UHPLC-Technologie ausgestattet wurde und seit 2004 das Potential dieser Technik zur Durchführung schneller Trennungen oder zur Erhöhung der Effizienz genau untersucht.