

Effizienzmaximierung mit Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen

100 000 Trennstufen in weniger als 5 Minuten dank
Säulenkopplung

Application Note

Lebensmittel, Umwelt, Chemikalien, Pharmazeutika

Autoren

Angelika Gratzfeld-Hüsgen und
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Deutschland

Abstract

Oberflächenporöse Säulen sind eine Alternative zu Säulen mit einer Partikelgröße unter 2 μm . Durch Kombination dieser Säulen mit dem Agilent 1290 Infinity LC-System lassen sich hoch effiziente Trennungen erzielen. Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen bieten:

- Niedrigeren Rückdruck
- Höchste Effizienz
- Vergleichbare Volumenkapazität



Agilent Technologies

Einführung

Aufgrund ihrer hohen Effizienz sind Säulen mit einer Partikelgröße unter 2 µm in letzter Zeit verstärkt ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Sie können bei höheren Flussraten als den mit der Van-Deemter-Gleichung beschriebenen Werten verwendet werden. Der Effizienzverlust bei höheren Flussraten ist im Vergleich zur Effizienz bei der optimalen Flussrate gering. Analysendauer und Zykluszeit lassen sich verringern, sodass die Ergebnisse schneller vorliegen.

Der Nachteil dieser Säulen besteht in den erheblich höheren Rückdrücken aufgrund der kleinen Partikelgrößen. In vielen Fällen, insbesondere bei langen Sub-2-µm-Säulen, müssen LC-Geräte Rückdrücken von > 400 bar standhalten.

Die Technologie für oberflächenporöse Partikel bietet eine Alternative für Analysen mit sehr hoher Auflösung¹, weil der Rückdruck bei diesen Säulen deutlich niedriger ist. Ihre Effizienz ist im Vergleich zu Säulen mit einer Partikelgröße unter 2 µm etwas geringer. Aufgrund des niedrigen Rückdrucks ist jedoch eine Säulenkopplung möglich, sodass sehr hohe Trennstufenzahlen erzielt werden können.

Diese Application Note zeigt, dass die Kopplung von drei langen Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen zu extrem hohen Effizienzen führt. Außerdem wird gezeigt, dass der Rückdruck unter 400 bar gehalten werden kann. Wenn spezielle LC-Geräte verfügbar sind, sind höhere Flussraten möglich, wodurch die Analysendauer und die Äquilibrationszeit verkürzt werden. Schließlich wurde noch ein Vergleich zwischen einer 2,7-µm-Säule mit poröser Außenschicht und einer Säule mit einer Partikelgröße unter 2 µm durchgeführt.

Experimentelle

Ausstattung

Als Versuchsanordnung wurde ein Agilent 1290 Infinity LC-System verwendet, ausgestattet mit einer binären Pumpe, einem automatischen Probengeber, einem thermostatisierten Säulenofen und einem Diodenarray-Detektor mit einer Zelle von 10 mm Schichtdicke.

Säulen

Es kamen eine Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT-Säule, 4,6 mm × 150 mm, 1,8 µm, und eine Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säule, 4,6 mm × 150 mm, 2,7 µm, zum Einsatz. Diese Säulen können bei bis zu 600 bar eingesetzt werden.

Software

Agilent ChemStation Software, Version B.04.02

Ergebnisse und Diskussion

Mögliche Vorteile oberflächenporöser Säulen

Hinter oberflächenporösen Säulen steckt eine Technologie, die auf Partikeln mit einem festen Kern und einer porösen Außenschicht beruht. Diese Partikel bestehen aus einem festen Kern mit 1,7 µm Durchmesser und einer porösen Silica-Außenschicht mit 0,5 µm Durchmesser. Insgesamt beträgt die Partikelgröße ungefähr 2,7 µm. Die 2,7 µm großen oberflächenporösen Partikel ermöglichen einen um 40 – 50 % niedrigeren Rückdruck und bieten 80 – 90 % der Effizienz vollständig poröser Partikel mit einer Größe unter 2 µm. Die oberflächenporösen Partikel haben eine kleinere Partikelgrößenverteilung als vollständig poröse Partikel. Die Säule wird damit homogener und die Diffusion in der Säule geringer. Gleichzeitig reduzieren die kleinen Partikel und die poröse Außenschicht den Widerstand gegen den Stofftransport. Das Ergebnis sind höhere Flussraten ohne Effizienzeinbußen^{1,2}.

Systemkonfiguration

In den folgenden Versuchsanordnungen wurde die Leistung der Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen beurteilt. Alle verwendeten Säulen hatten einen Innendurchmesser von 4,6 mm und eine Säulenlänge von 150 mm.

- Beurteilung der Trennstufenzahl einer Einzelsäule bei 1,5 ml/min
- Beurteilung der Trennstufenzahl bei drei gekoppelten Säulen bei 1,5 ml/min
- Beurteilung der Trennstufenzahl bei drei gekoppelten Säulen bei höheren Flussraten
- Präzision der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen und Gradientenbedingungen
- Vergleich zwischen einer Säule mit poröser Außenschicht und einer Säule mit einer Partikelgröße unter 2 µm

Die Trennleistung der Säule (Trennstufenzahl) wird normalerweise unter isokratischen Bedingungen gemessen. Bei einem symmetrischen Peak dient die folgende Gleichung der Berechnung der Trennstufenzahl (N):

$$N = 5,54 (RT/W)^2$$

RT ist die Retentionszeit und W die Peakbreite auf halber Höhe.

Beurteilung der Trennstufenzahl einer Einzelsäule

Die Trennstufenzahl einer Einzelsäule wurde mithilfe der folgenden Verbindungen beurteilt: Uracil, Acetophenon, Benzol und Toluol.

In Abbildung 1 sind das resultierende Chromatogramm und die festgestellten Trennstufenzahlen gezeigt.

Unter den angegebenen Chromatographiebedingungen wurde für Toluol eine Trennstufenzahl von 35 000 Trennstufen pro Säule erzielt.

Beurteilung der Trennstufenzahl bei drei gekoppelten Säulen

Die Trennstufenzahl einer Säule beträgt ungefähr 35 000 Trennstufen. Daher ist zu erwarten, dass drei Säulen eine Trennstufenzahl von 105 000 Trennstufen ergeben. Die Säulen wurden mit Edelstahlkapillaren der Größe 90 x 0,12 mm gekoppelt, und die Ermittlung der Trennstufenzahlen erfolgte bei unterschiedlichen Flussraten.

Die resultierenden Chromatogramme sind in Abbildung 2 gezeigt. Bei Verwendung eines für 400 bar geeigneten LC-Systems kann bei einer Flussrate von 1 ml/min eine Trennstufenzahl von ungefähr 80 000 Trennstufen erreicht werden. Mit diesem LC-System, das Drücken bis zu 1200 bar standhält, lassen sich jedoch höhere Flussraten und Effizienzen erzielen.

Die bei einer Flussrate von 1,5 ml/min erzielte Trennstufenzahl von ungefähr 103 000 Trennstufen entspricht ungefähr dem erwarteten Wert.

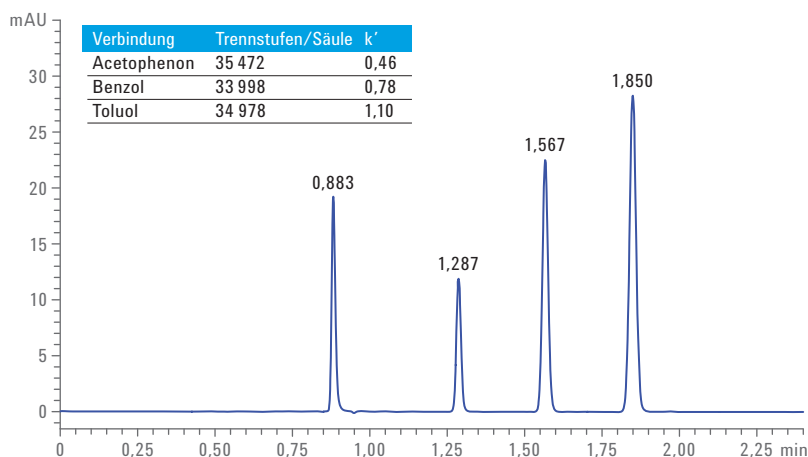
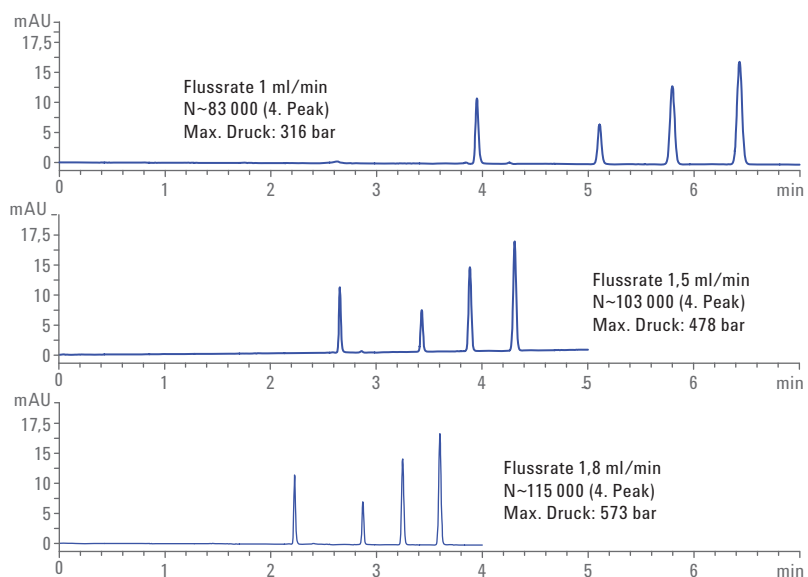


Abbildung 1. Chromatogramm zur Ermittlung von N der Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säule, 4,6 x 150 mm.

Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Säule	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Probe	Thioharnstoff, Acetophenon, Benzol, Toluol
Mobile Phase	Wasser:ACN = 30:70
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	50 °C
Detektor	DAD 254 nm/10, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Standardzelle



Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Probe	Thioharnstoff, Acetophenon, Benzol, Toluol
Säule	Drei gekoppelte Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18-Säulen, 150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Mobile Phase	Wasser:ACN = 20:80
Flussrate	1, 1,5, 1,8 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	60 °C
Detektor	DAD 254 nm/10, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Standardzelle

Abbildung 2. Zwei Chromatogramme zur Ermittlung von N von drei gekoppelten Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen, 150 mm x 4,6 mm, bei unterschiedlichen Flussraten.

Das beste Ergebnis für Toluol mit einer Trennstufenzahl von ungefähr 115 000 Trennstufen wurde bei 1,8 ml/min mit einer Retentionszeit von < 5 Minuten erzielt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Trennstufenzahlen bei einer Flussrate von 1,8 ml/min.

Verbindung	Trennstufen	k'
Acetophenon	114 120	0,29
Benzol	109 931	0,46
Toluol	114 800	0,62

Bei höheren k'-Werten sind die Ergebnisse durch Kopplung von drei Säulen zufriedenstellend. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min (Abbildung 3).

Präzision der Retentionszeiten unter isokratischen Bedingungen

Die Präzision bei isokratischen Bedingungen wurde bei 1,5 ml/min untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammen mit sechs hintereinander durchgeführten Analysen in Überlagerung gezeigt. Die Präzision der Retentionszeiten beträgt < 0,034 % RSD, und die Präzision der Flächen beträgt < 0,66 % RSD, außer bei Uracil.

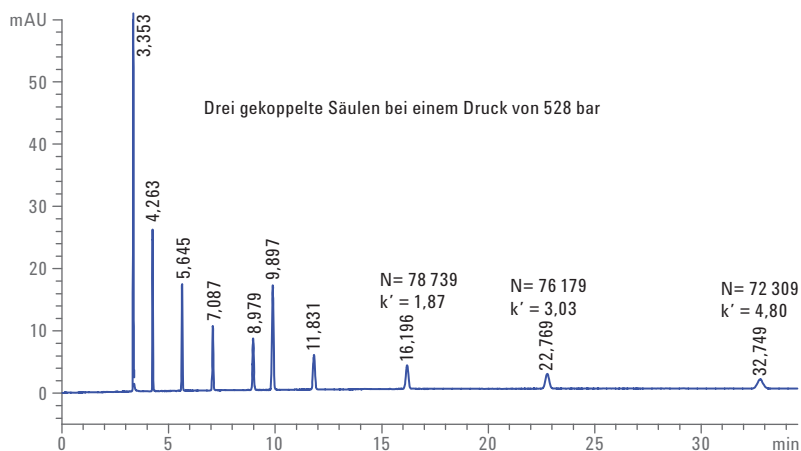
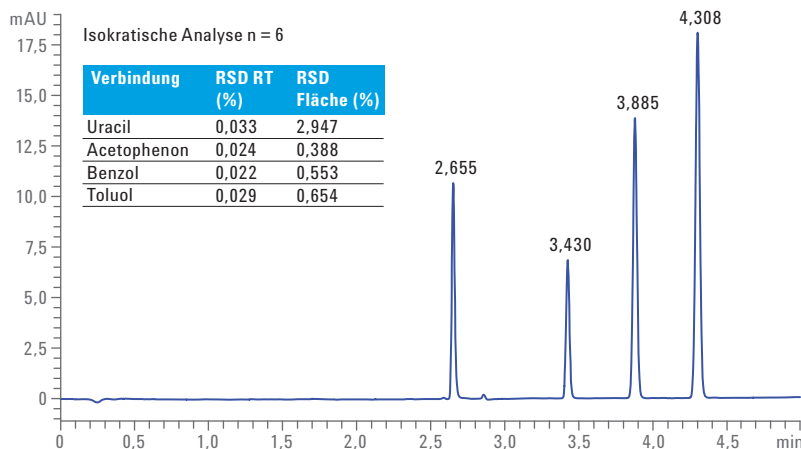


Abbildung 3. Trennstufenzahlen bei höheren k'-Werten mit drei gekoppelten Säulen bei 528 bar und einer Flussrate von 1,2 ml/min.

Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Probe	Thioharnstoff + Testprobe: Testreihe aus neun Verbindungen mit je 100 ng/μl, gelöst in Wasser/ACN (65/35) 1. Acetanilid, 2. Acetophenon, 3. Propiophenon, 4. Butyrophenon (200 ng/μl), 5. Benzophenon, 6. Valerophenon, 7. Hexanophenon, 8. Heptanophenon, 9. Octanophenon
Säule	Drei gekoppelte Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18-Säulen, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Mobile Phase	ACN/Wasser 60/40
Säulentemperatur	60 °C
Flussrate	1,2 ml/min
Detektor	DAD 254 nm/10 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Standardzelle



Verbindung	RSD RT (%)	RSD Fläche (%)
Uracil	0,033	2,947
Acetophenon	0,024	0,388
Benzol	0,022	0,553
Toluol	0,029	0,654

Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Probe	Uracil, Acetophenon, Benzol, Toluol
Säule	Drei gekoppelte Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18-Säulen, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Mobile Phase	Wasser:ACN = 20:80
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	1 μl
Säulentemperatur	60 °C
Detektor	DAD 254 nm/10 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Standardzelle

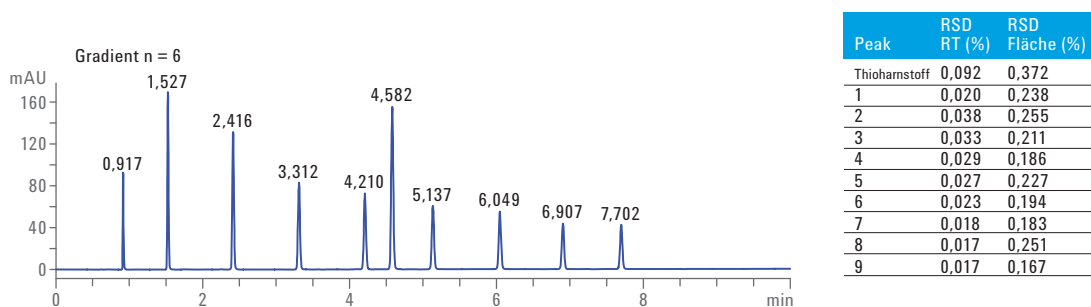
Abbildung 4. Überlagerung von sechs nacheinander durchgeführten Analysen unter isokratischen Bedingungen und Präzisionsdaten in Bezug auf Retentionszeiten und Flächen.

Präzision der Retentionszeiten und Flächen unter Gradientenbedingungen

Für die Ermittlung der Präzision bei der Gradientenanalyse wurde ein Gradient von 35 bis 95 % in 10 Minuten verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammen mit sechs hintereinander durchgeführten Analysen in Überlagerung gezeigt.

Bei allen Verbindungen, außer bei Thioharnstoff, wurde eine hervorragende Präzision der Retentionszeiten erzielt (RSD < 0,04 %) (Abbildung 5).

Die RSD-Werte der Flächen aller Verbindungspeaks lagen nach Injektion von 1 µl bei unter 0,38 %.



Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Probe	Thioharnstoff + Testprobe: Testreihe aus neun Verbindungen mit je 100 ng/µl, gelöst in Wasser/ACN (65/35) 1. Acetanilid, 2. Acetophenon, 3. Propiophenon, 4. Butyrophenon (200 ng/µl), 5. Benzophenon, 6. Valerophenon, 7. Hexanophenon, 8. Heptanophenon, 9. Octanophenon
Säule	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Mobile Phase	Wasser und ACN
Gradient	Bei 0 Minuten 35 % ACN, bei 10 Minuten 95 % ACN
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	60 °C
Detektor	DAD 254 nm/10 nm, Ref. 400/100 nm, 20 Hz, Standardzelle

Abbildung 5. Überlagerung von 10 nacheinander durchgeführten Gradientenanalysen und Präzisionsdaten in Bezug auf Retentionszeiten und Flächen.

Vergleich der Peakkapazität zwischen einer Säule mit poröser Außenschicht und einer Säule mit einer Partikelgröße unter 2 µm

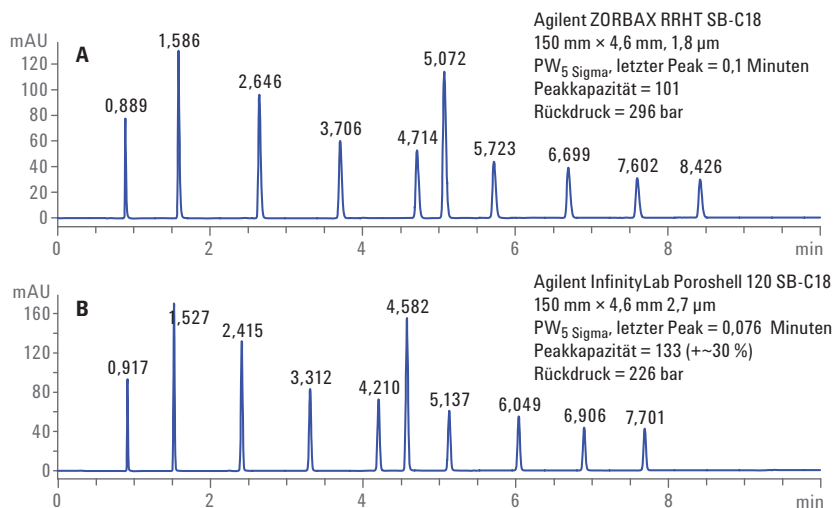
Zur Veranschaulichung des Unterschieds zwischen einer Säule mit poröser Außenschicht und einer Säule mit einer Partikelgröße unter 2 µm wurden zwei 150-mm-Säulen mit einem ID von 4,6 mm bei der Analyse einer Testreihe von 10 Verbindungen verglichen (Abbildung 6).

Die Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säule hat kürzere Elutionszeiten und kleinere Peakbreiten. Somit ergibt sich für die Säule mit poröser Außenschicht eine höhere Peakkapazität. Die InfinityLab Poroshell 120-Säule ergab 133 Peaks mit einer höheren Peakkapazität als die Sub-2-µm-Säule mit einer Peakkapazität von 101 Peaks. Damit ergibt sich für die InfinityLab Poroshell 120-Säule im Vergleich zu der Sub-2-µm-Säule unter den verwendeten Bedingungen eine um 30 % höhere Effizienz.

Vergleich der Volumenkapazität

Um zu prüfen, ob Säulen mit poröser Außenschicht dieselbe oder eine niedrigere Volumenkapazität als mit 1,8-µm-Partikeln gepackte Säulen aufweisen, wurde eine hoch konzentrierte Probe injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl und die Konzentration ungefähr 20 µg in 10 µl (Abbildung 7).

Was den Hauptpeak betraf, waren unter den gewählten Bedingungen keine wesentlichen Unterschiede zu beobachten. Die Peakbreite war bei der InfinityLab Poroshell 120-Säule etwas geringer, weil der Peak in diesem Fall früher eluierte. Eine kleinere Peakbreite ist ein typisches Phänomen.



Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Probe	Thioharnstoff + Testprobe: Testreihe aus neun Verbindungen mit je 100 ng/µl, gelöst in Wasser/ACN (65/35) 1. Acetanilid, 2. Acetophenon, 3. Propiophenon, 4. Butyrophenon (200 ng/µl), Benzophenon, 6. Valerophenon, 7. Hexanophenon, 8. Heptanophenon, 9. Octanophenon
Säule	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 1,8 µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Mobile Phase	Wasser und ACN
Gradient	0 Minuten 35 % ACN, 10 Minuten 95 % ACN
Flussrate	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	1 µl
Säulentemperatur	60 °C
Detektor	DAD 254 nm/10, Ref. 400/100 nm, 20 Hz, Standardzelle

Abbildung 6. Chromatogramme eines Phenongemisches bei Analyse auf einer Säule mit poröser Außenschicht und einer Sub-2-µm-Säule.

Vergleich der Signal/Rauschen-Verhältnisse

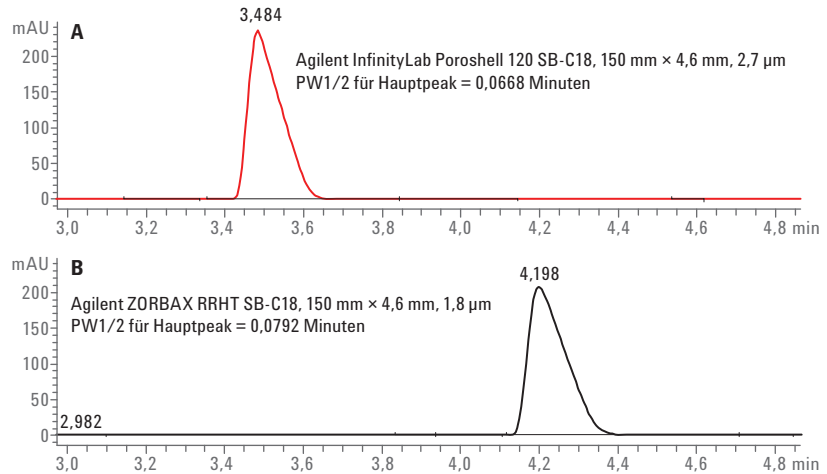
Verunreinigungen wurden in einem pharmazeutischen Wirkstoff analysiert, um die Signal/Rauschen-Verhältnisse (S/N) zu untersuchen. Die Verunreinigungen lagen im Bereich von 0,02 – 0,03 %. In Abbildung 7 sind die Chromatographiebedingungen aufgeführt.

Abbildung 8 zeigt einen Abschnitt der vollständigen Chromatogramme in Überlagerung. Die rote Kurve gibt das mit der InfinityLab Poroshell 120-Säule erhaltene Chromatogramm wieder, die schwarze Kurve das mit der Sub-2- μm -Säule erhaltene Chromatogramm.

In Tabelle 2 sind die S/N-Berechnungen für beide Säulen kombiniert. Die Verunreinigungen 1 und 2 wurden auf der InfinityLab Poroshell 120-Säule und auf der Sub-2- μm -Säule analysiert.

Tabelle 2. Vergleich der Signal/Rauschen-Verhältnisse (S/N) zwischen Säulen mit poröser Außenschicht und Säulen mit 1,8- μm -Partikeln.

Peak	Agilent InfinityLab Poroshell 120 S/N	1,8 μm S/N
1	14	13,6
2	12,8	12



Chromatographiebedingungen

Parameter	Wert
Testprobe	Tramadol 2,022 ml/ml mit Verunreinigungen
Säule	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm
Pumpe	
Lösemittel A	Wasser + 0,2 % TFA
Lösemittel B	ACN + 0,16 % TFA
Gradient	17 bis 45 % B in 5 Minuten, Stoppzeit: 7 Minuten, Nachlaufzeit: 3 Minuten
Flussrate	1,5 ml/min
Automatischer Probengeber	
Injektionsvolumen	10 μl
Waschdauer	10 s
Thermostatisierter Säulenofen	
Temperatur	30 $^{\circ}\text{C}$
DAD	1290 270/10 nm, Ref. 360/100 nm, 20 Hz, Standarddurchflusszelle mit einer Schichtdicke von 10 mm

Abbildung 7. Vergleich der Kapazität zwischen einer Säule mit poröser Außenschicht und einer Sub-2- μm -Säule; Injektionsvolumen 10 μl = 20 μg .

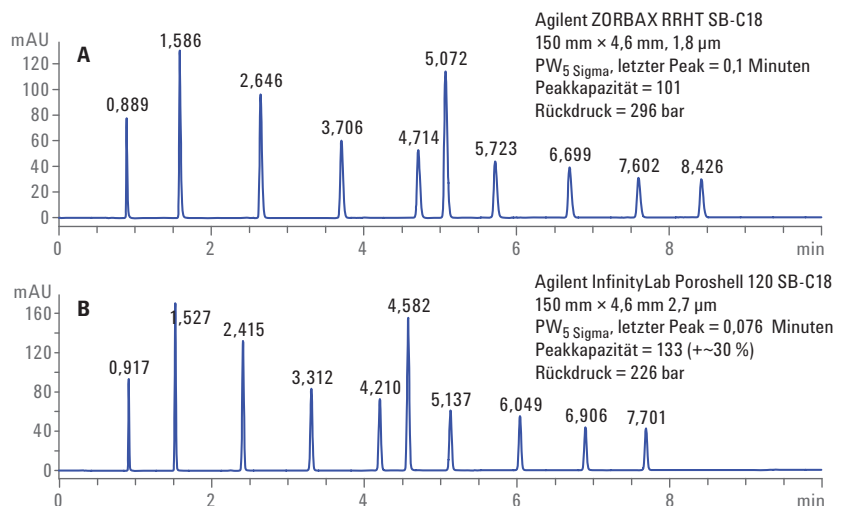


Abbildung 8. Vergleich des Signal/Rauschen-Verhältnisses; die rote Kurve gibt die Säule mit poröser Außenschicht wieder, die schwarze Kurve die 1,8- μm -Partikel-Säule. TFA wurde als Modifier verwendet.

Schlussfolgerung

Säulen mit poröse Außenschicht sind als echte Alternative zu Säulen mit einer Partikelgröße unter 2 µm zu betrachten. Der niedrigere Rückdruck ermöglicht Flussraten von 1 ml/min bei einer 4,6 x 150 mm, 2,7 µm großen Säule, ohne dass der Grenzwert von 400 bar überschritten wird. In diesem Fall lassen sich 35 000 Trennstufen bzw. mehr als 235 000 Trennstufen/Meter erzielen.

Die Kopplung von drei 4,6 x 150 mm großen Säulen ergibt eine Trennstufenzahl von 100 000 in unter 5 Minuten ohne Überschreitung des Grenzwerts von 600 bar.

Agilent InfinityLab Poroshell 120-Säulen ergeben hervorragende Präzisionsdaten bei isokratischen Analysen und Gradientenanalysen.

Unter jeweils denselben Chromatographiebedingungen sind für InfinityLab Poroshell 120-Säulen typischerweise kürzere Elutionszeiten als bei ähnlichen Sub-2-µm-Säulen mit gebundener Phase zu erwarten. Die kürzeren Elutionszeiten führen zu kleineren Peakbreiten und somit zu höheren Peakkapazitäten.

Literatur

1. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D. Fused-core particle technology as an alternative to sub-2-µm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3104-3109.
2. Griiti, F.; *et al.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. of Chromatog. A* **2007**, *1157*, 289-303.

www.agilent.com/chem

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Gedruckt in den USA, 1. Juni 2016
5990-5602DEE



Agilent Technologies