



Ottimizzazione dell'efficienza grazie alle colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120

100.000 piatti in meno di 5 minuti usando la tecnologia
delle colonne accoppiate

Nota applicativa

Alimenti, Ambiente, Chimica, Farmaceutica

Autori

Angelika Gratzfeld-Hüsgen ed
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Germania

Abstract

Le colonne basate su tecnologie a superficie porosa rappresentano un'alternativa alle colonne basate su particelle inferiori a 2 μm . La combinazione di queste colonne con il sistema LC Agilent 1290 Infinity produce separazioni a elevata efficienza. Le colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 offrono:

- Contropressione inferiore
- Maggiore efficienza
- Capacità comparabile



Agilent Technologies

Introduzione

Recentemente, le colonne con particelle inferiori a 2 µm hanno riscosso un forte interesse per la loro elevata efficienza. Possono essere usate a flussi superiori rispetto a quelli valutati dall'equazione di Van Deemter. La perdita di efficienza a flussi superiori è minore rispetto all'efficienza al flusso ottimale. Il tempo di analisi e la durata del ciclo possono essere abbreviati, con risultati più rapidi.

Lo svantaggio di queste colonne è che si ottengono contropressioni significativamente superiori a causa delle dimensioni ridotte delle particelle. In molti casi, specialmente per le colonne lunghe con particelle inferiori a 2 µm, la strumentazione LC deve permettere contropressioni > 400 bar.

La tecnologia con particelle a superficie porosa offre un'alternativa alle analisi ad altissima risoluzione¹ in quanto queste colonne mostrano una contropressione significativamente inferiore. L'efficienza di queste colonne, rispetto a quelle con particelle inferiori a 2 µm, è leggermente inferiore. Grazie alla minore contropressione, è possibile ottenere un numero di piatti molto elevato accoppiando le colonne.

Questa Nota applicativa dimostra che l'accoppiamento di tre colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 lunghe consente di ottenere efficienze estremamente elevate. Dimostra inoltre che la contropressione può essere mantenuta al di sotto di 400 bar, a meno che non sia disponibile strumentazione LC speciale. In questo caso sono possibili flussi più elevati per risparmiare tempo di analisi ed equilibrare. Infine, è stato effettuato un confronto tra una colonna con porosità superficiale da 2,7 µm e una colonna con dimensioni delle particelle inferiori a 2 µm completamente porose.

Sperimentale

Strumento

Per gli esperimenti è stato utilizzato un sistema LC Agilent 1290 Infinity dotato di pompa binaria, autocampionatore, comparto colonna termostato e rivelatore a serie di diodi con cella con lunghezza del percorso di 10 mm.

Colonne

Sono state usate una colonna Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT 4,6 mm × 150 mm, 1,8 µm e una colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 mm × 150 mm, 2,7 µm. Queste colonne possono essere usate fino a 600 bar.

Software

Software Agilent ChemStation
revisione B.04.02

Risultati e discussione

Vantaggi potenziali delle particelle a superficie porosa

La tecnologia per particelle a superficie porosa si basa su particelle con nucleo solido e uno strato con superficie porosa. Queste particelle presentano un nucleo solido di 1,7 µm e uno strato in silice porosa di 0,5 µm. In totale, la dimensione delle particelle è di circa 2,7 µm. Le particelle con superficie porosa di 2,7 µm forniscono una contropressione inferiore del 40-50% e un'efficienza pari all'80-90% rispetto alle particelle totalmente porose con dimensioni inferiori a 2 µm. Le particelle con superficie porosa presentano una distribuzione più ristretta delle dimensioni delle particelle rispetto alle particelle totalmente porose. Questo determina una colonna più omogenea e riduce la diffusione nella colonna. Allo stesso tempo, le particelle piccole e l'involucro poroso permettono una minore resistenza al trasferimento di massa. Ne conseguono flussi superiori senza perdita di efficienza^{1,2}.

Configurazione del sistema

I seguenti esperimenti hanno valutato le prestazioni delle colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120. Il diametro interno era di 4,6 mm e la lunghezza di 150 mm per tutte le colonne usate.

- Valutazione del numero di piatti di una colonna singola a 1,5 mL/min
- Valutazione del numero di piatti per tre colonne accoppiate a 1,5 mL/min
- Valutazione del numero di piatti per tre colonne accoppiate a flussi superiori
- Precisione dei tempi di ritenzione usando condizioni isocratiche e in gradiente
- Confronto tra una colonna con particelle porosa in superficie e una con particelle con dimensioni inferiori a 2 µm

L'efficienza della colonna (numero di piatti) è misurata generalmente usando condizioni isocratiche. Per un picco simmetrico usare la seguente equazione per calcolare il numero di piastre (N):

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

RT è il tempo di ritenzione e W la larghezza del picco a metà altezza.

Valutazione del numero di piatti per una colonna singola

Per valutare il numero di piatti per una singola colonna sono stati usati i seguenti composti: uracile, acetofenone, benzene e toluene.

Il cromatogramma risultante e il numero di piatti valutati sono illustrati nella Figura 1.

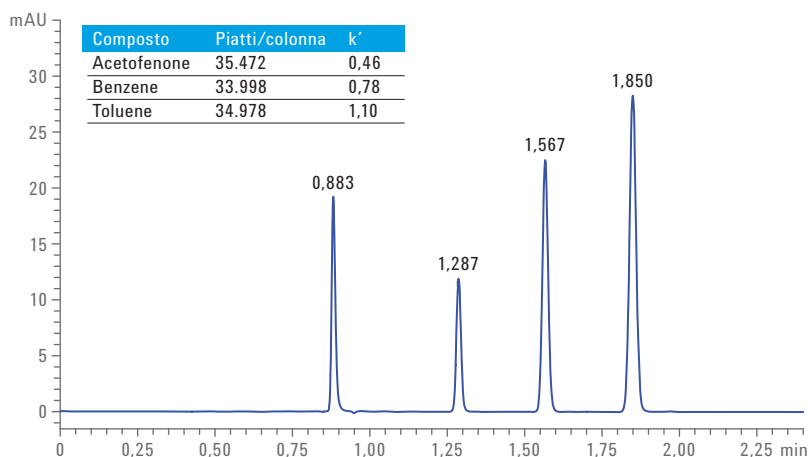
Il risultato è stato di circa 35.000 piatti/colonna per il toluene nelle condizioni cromatografiche specificate.

Valutazione del numero di piatti per tre colonne accoppiate

Il numero di piatti per una colonna è di circa 35.000. Tre colonne dovrebbero fornire un numero di piatti pari a 105.000. L'accoppiamento delle colonne è stato effettuato usando capillari in acciaio inossidabile, da 90 x 0,12 mm. Il numero di piatti è stato valutato per diversi flussi.

I cromatogrammi risultanti sono mostrati nella Figura 2. Se viene utilizzato un sistema LC da 400 bar, si possono ottenere circa 80.000 piastre a un flusso di 1 mL/min. Con questo sistema LC si possono tuttavia ottenere flussi ed efficienze più elevati, che permettono pressioni fino a 1.200 bar.

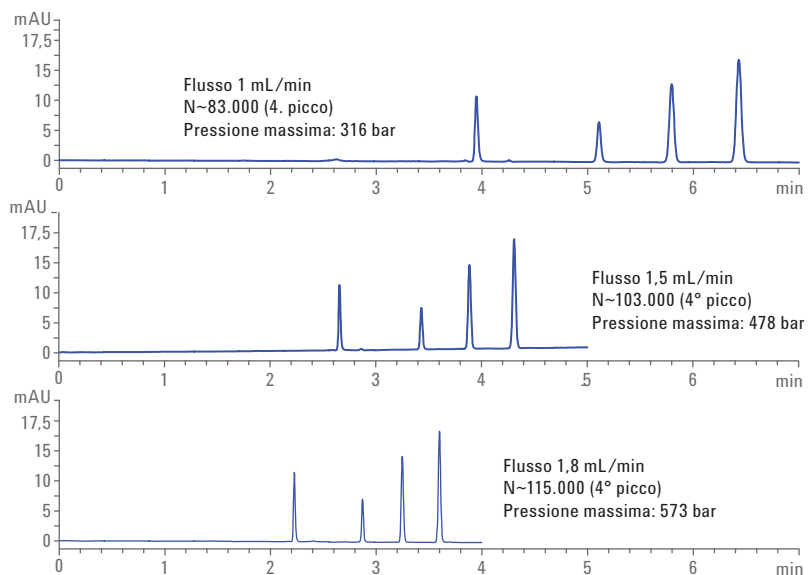
Al flusso di 1,5 mL/min, il numero di piatti ottenuto, pari a circa 103.000, è prossimo al valore atteso.



Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Campione	Tiourea, acetofenone, benzene, toluene
Fase mobile	Acqua:ACN = 30:70
Flusso	1,5 mL/min
Volume di iniezione	1 µL
Temperatura della colonna	50 °C
Rivelatore	DAD 254 nm/10, Rif 360/100 nm, 20 Hz, cella standard

Figura 1. Cromatogramma per valutare N per la colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120, 4,6 x 150 mm



Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Campione	Tiourea, acetofenone, benzene, toluene
Colonna	Tre colonne accoppiate Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Fase mobile	Acqua:ACN = 20:80
Flusso	1, 1,5, 1,8 mL/min
Volume di iniezione	1 µL
Temperatura della colonna	60 °C
Rivelatore	DAD 254 nm/10, Rif 360/100 nm, 20 Hz, cella standard

Figura 2. Due cromatogrammi per valutare N per tre colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120, 150 mm x 4,6 mm a diversi flussi.

Il miglior risultato per il toluene, pari a circa 115.000 piatti, è stato ottenuto a 1,8 mL/min con un tempo di ritenzione <5 minuti (Tabella 1).

Per valori di k' superiori si ottengono buoni risultati usando tre colonne accoppiate. È stato usato un flusso di 1,2 mL/min (Figura 3).

Precisione dei tempi di ritenzione usando condizioni isocratiche

È stata valutata la precisione in condizioni isocratiche a 1,5 mL/min e i risultati sono mostrati nella Figura 4 con la sovrapposizione di sei analisi consecutive. La precisione dei tempi di ritenzione è <0,034% RSD e la precisione per le aree è <0,66% RSD, tranne per l'uracile.

Tabella 1. Numero di piastre al flusso di 1,8 mL/min.

Composto	Piastre	k'
Acetofenone	114.120	0,29
Benzene	109.931	0,46
Toluene	114.800	0,62

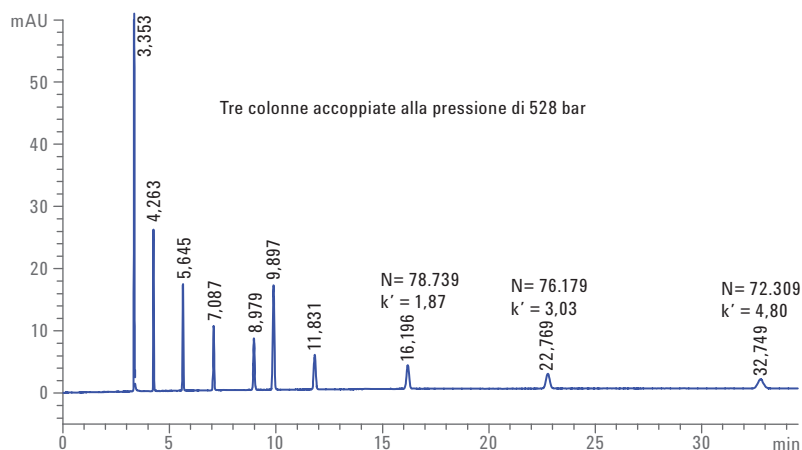


Figura 3. Numero di piastre a valori superiori di k' per tre colonne accoppiate a 528 bar e flusso di 1,2 mL/min.

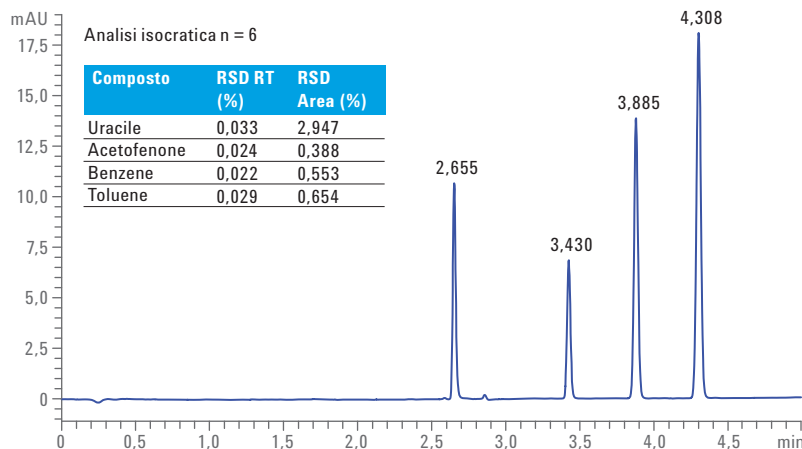


Figura 4. Sovrapposizione di 6 analisi consecutive usando condizioni isocratiche e dati di precisione per i tempi di ritenzione e le aree.

Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Campione	Tiourea + campione controllo: Insieme di nove composti, 100 ng/μL ciascuno, disciolti in acqua/ACN (65/35) 1. Acetanilide, 2. Acetofenone, 3. Propiofenone, 4. Butirofenone (200 ng/μL), 5. Benzofenone, 6. Valerofenone, 7. Esanofenone, 8. Eptanofenone, 9. Ottanofenone
Colonna	Tre colonne accoppiate Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Fase mobile	ACN/acqua 60/40
Temperatura della colonna	60 °C
Flusso	1,2 mL/min
Rivelatore	DAD 254 nm/10 nm, Rif 360/100 nm, 20 Hz, cella standard

Condizioni cromatografiche

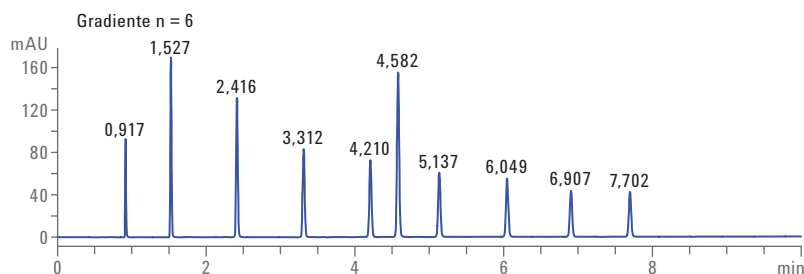
Parametro	Valore
Campione	Uracile, acetofenone, benzene, toluene
Colonna	Tre colonne accoppiate Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 μm
Fase mobile	Acqua:ACN = 20:80
Flusso	1,5 mL/min
Volume di iniezione	1 μL
Temperatura della colonna	60 °C
Rivelatore	DAD 254 nm/10 nm, Rif 360/100 nm, 20 Hz, cella standard

Precisione dei tempi di ritenzione e delle aree usando condizioni in gradiente

La precisione dell'analisi in gradiente è stata valutata usando un gradiente dal 35 al 95% in 10 minuti. I risultati della sovrapposizione di sei analisi consecutive sono mostrati nella Figura 5.

È stata ottenuta un'eccellente precisione per i tempi di ritenzione di tutti i composti (RSD <0,04%), tranne per la tiourea (Figura 5).

Le RSD per le aree dei picchi di tutti i composti erano inferiori allo 0,38% per un'iniezione di 1 µL.



Picco	RSD RT (%)	RSD Area (%)
Tiourea	0,092	0,372
1	0,020	0,238
2	0,038	0,255
3	0,033	0,211
4	0,029	0,186
5	0,027	0,227
6	0,023	0,194
7	0,018	0,183
8	0,017	0,251
9	0,017	0,167

Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Campione	Tiourea + campione controllo: Insieme di nove composti, 100 ng/µL ciascuno, disciolti in acqua/ACN (65/35) 1. Acetanilide, 2. Acetofenone, 3. Propiofenone, 4. Butirrofenone (200 ng/µL), 5. Benzofenone, 6. Valerofenone, 7. Esanofenone, 8. Eptanofenone, 9. Ottanofenone
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Fase mobile	Acqua e ACN
Gradiente	A 0 minuti ACN 35%, a 10 minuti ACN 95%
Flusso	1,5 mL/min
Volume di iniezione	1 µL
Temperatura della colonna	60 °C
Rivelatore	DAD 245/10 nm, Rif 400/100 nm, 20 Hz, cella standard

Figura 5. Sovrapposizione di 10 analisi in gradiente consecutive e dati di precisione per i tempi di ritenzione e le aree.

Confronto della capacità del picco tra una colonna con strato poroso superficiale e una con particelle con dimensioni inferiori a 2 µm

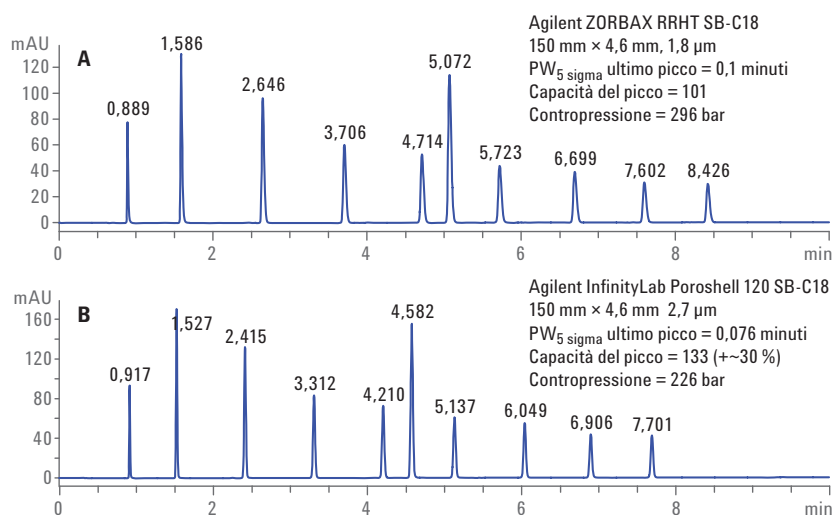
Per illustrare la differenza tra una colonna con strato poroso superficiale e una con particelle con dimensioni inferiori a 2 µm, sono state confrontate due colonne da 150 x 4,6 mm d.i. analizzando un insieme di 10 composti (Figura 6).

La colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120 mostra tempi di eluizione più brevi e una minore larghezza del picco, il che determina una capacità del picco superiore per la colonna con strato poroso. La colonna InfinityLab Poroshell 120 mostra 133 picchi con una capacità del picco superiore rispetto alla colonna con particelle inferiori a 2 µm, che ha una capacità del picco di 101 picchi. Questo indica un'efficienza del 30% maggiore per la colonna InfinityLab Poroshell 120 rispetto alla colonna con particelle con dimensioni inferiori a 2 µm nelle condizioni utilizzate.

Confronto della capacità

Per testare se le colonne con strato poroso hanno una capacità uguale o inferiore alle colonne impaccate con particelle di 1,8 µm, è stato iniettato un campione altamente concentrato. Il volume di iniezione era di 10 µL e la concentrazione era di circa 20 µg in 10 µL (Figura 7).

Non sono state osservate differenze significative per quanto riguarda il picco principale usando le condizioni selezionate. La larghezza del picco per la colonna InfinityLab Poroshell 120 era leggermente inferiore perché in questo caso il picco eluiva prima. La larghezza del picco è tipicamente inferiore.



Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Campione	Tiourea + campione controllo: Insieme di nove composti, 100 ng/µL ciascuno, disciolti in acqua/ACN (65/35) 1. Acetanilide, 2. Acetofenone, 3. Propiofenone, 4. Butirrofenone (200ng/µL), Benzofenone, 6. Valerofenone, 7. Esanofenone, 8. Eptanofenone, 9. Ottanofenone
Colonna	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
Fase mobile	Acqua e ACN
Gradiente	0 minuti ACN 35%, 10 minuti ACN 95%
Flusso	1,5 mL/min
Volume di iniezione	1 µL
Temperatura della colonna	60 °C
Rivelatore	DAD 245/10 nm, Rif 400/100 nm, 20 Hz, cella standard

Figura 6. Cromatogrammi di una miscela di fenone analizzato su colonne con involucro poroso e con particelle di dimensioni inferiori a 2 µm

Confronto del rapporto segnale-rumore

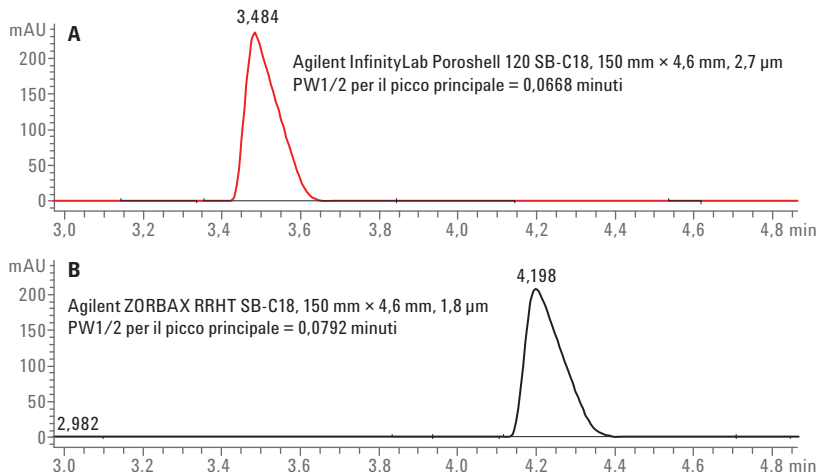
Per valutare il rapporto segnale-rumore (S/N) sono state analizzate le impurezze in un campione farmaceutico. Le impurezze erano presenti nell'intervallo percentuale 0,02-0,03. Le condizioni cromatografiche sono elencate nella Figura 7.

La Figura 8 mostra una sovrapposizione di una sezione dei cromatogrammi completi. La linea rossa rappresenta il cromatogramma ottenuto con InfinityLab Poroshell 120 mentre la linea nera rappresenta il cromatogramma ottenuto con una colonna con particelle di dimensioni inferiori a 2 µm.

Nella Tabella 2, sono combinati i calcoli del rapporto S/N per entrambe le colonne. Le impurezze 1 e 2 sono state analizzate con la colonna InfinityLab Poroshell 120 e sulla colonna con particelle di dimensioni inferiori a 2 µm.

Tabella 2. Confronto dei rapporti segnale-rumore per le colonne con involucro poroso e con particelle da 1,8 µm

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



Condizioni cromatografiche

Parametro	Valore
Campione controllo	Tramadololo 2,022 mL/mL contenente impurezze
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 2,7 µm
Pompa	
Solvente A	Acqua + TFA 0,2%
Solvente B	ACN + TFA 0,16%
Gradiente	Dal 17 al 45% di B in 5 minuti, Tempo finale: 7 minuti, Tempo post analisi: 3 minuti
Flusso	1,5 mL/min
Autocampionatore	
Volume di iniezione	10 µL
Tempo di lavaggio	10 s
Comparto colonna termostata	
Temperatura	30 °C
DAD	1290 270/10 nm, Rif. 360/100 nm, 20 Hz, Cella di flusso standard con lunghezza del percorso di 10 mm

Figura 7. Confronto delle capacità di colonne a strato poroso superficiale e a particelle con dimensioni inferiori a 2 µm; volume di iniezione 10 µL = 20 µg

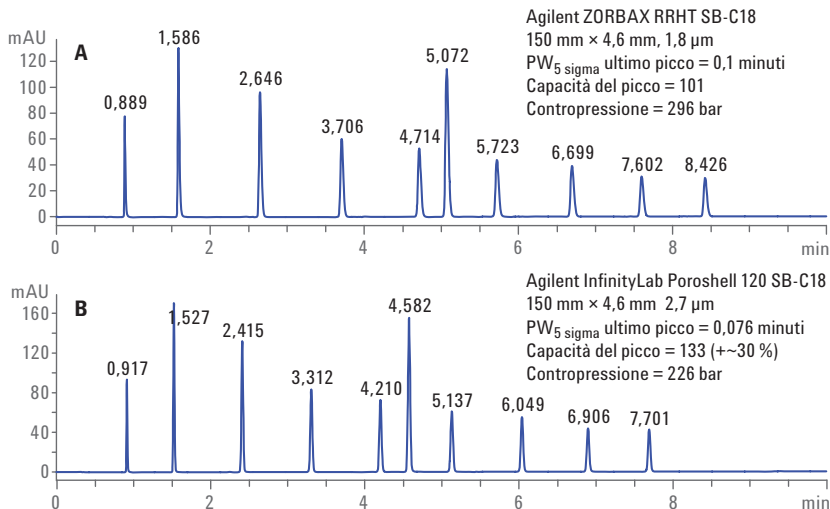


Figura 8. Confronto del rapporto segnale-rumore; la linea rossa rappresenta la colonna a strato poroso e la linea nera rappresenta la colonna con particelle di 1,8 µm. È stato usato TFA come modificatore.

Conclusioni

Le colonne con involucro poroso rappresentano una reale alternativa alle colonne con particelle di dimensioni inferiori a 2 µm. La contropressione inferiore permette flussi di 1 mL/min per una colonna da 4,6 × 150 mm, 2,7 µm senza superare il limite di 400 bar. In questo caso, sono ottenibili 35.000 piastre o più di 235.000 piastre/metro.

L'accoppiamento di tre colonne da 4,6 x 150 mm determina un numero di piastre pari a 100.000 in meno di 5 minuti senza superare il limite di 600 bar.

Le colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 mostrano un'eccellente precisione dei dati delle analisi isocratiche e in gradiente.

Tipicamente, per le colonne InfinityLab Poroshell 120 si possono prevedere tempi di eluizione più brevi rispetto alle colonne simili a fase legata con particelle di dimensioni inferiori a 2 µm se vengono applicate le stesse condizioni cromatografiche. I tempi di eluizione più brevi determinano larghezze del picco inferiori e, di conseguenza, capacità del picco superiori.

Bibliografia

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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
Pubblicato negli Stati Uniti, 1 giugno 2016
5990-5602ITE



Agilent Technologies