

Tücken der UHPLC

Wissenswertes im Bereich < 2 Mikronpartikel

Rapid Resolution High Definition - RRHD Säulen
Rapid Resolution High Throughput - RRHT Säulen
Rapid Resolution Cartridge – Kartuschensäulen
(Poroshell120)



Dr. Ulrike Jegle
Produktspezialistin Säulen
Agilent Technologies

Ultra-schnelle und hochauflösende Analyse

Wann nutze ich welche Säule?!

ultra-schnelle Analyse:

- Hohe Probenzahl oder schnelle Antwortzeiten
- kurzer, generischer Gradient
- Kurze Säule
- Hohe Flussrate
- 1.8 um Partikel

Hochauflösende Analyse:

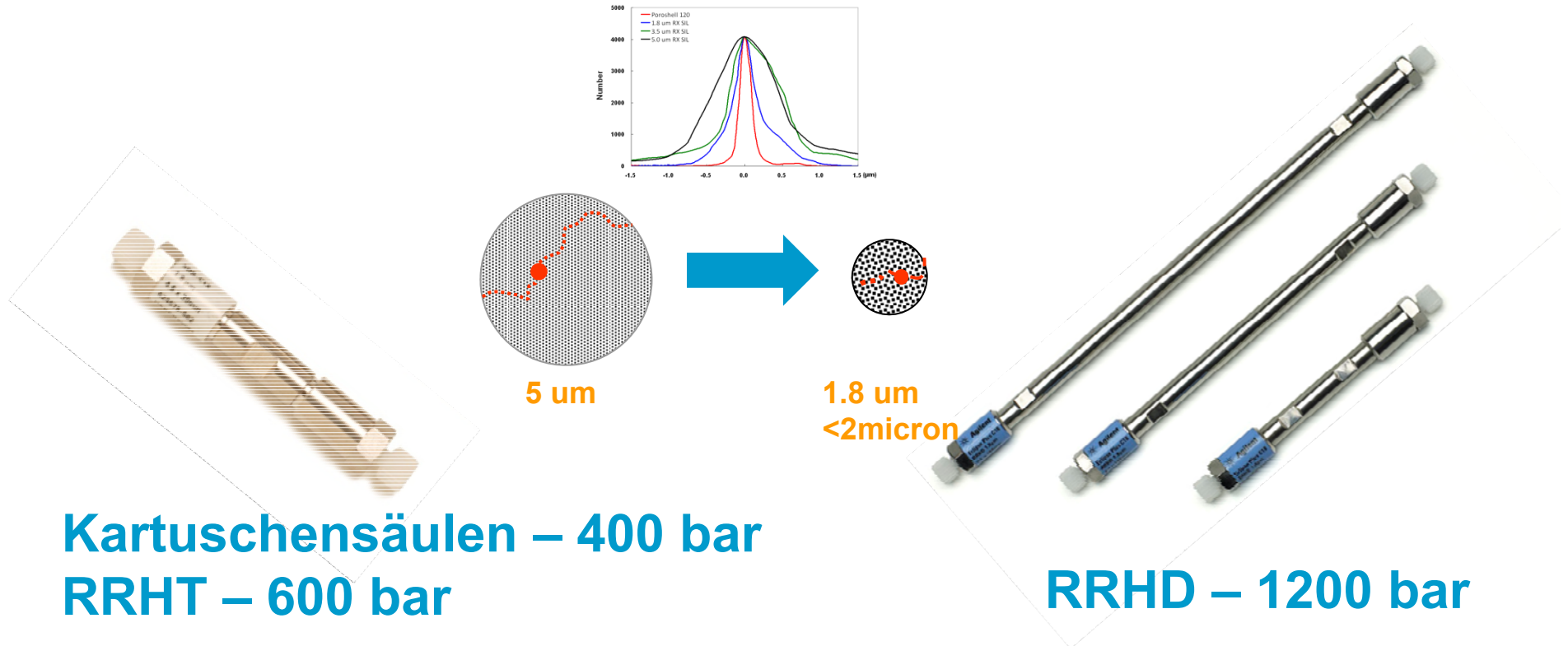
- komplexe Probe mit der Trennung jeder Komponente,
- lange Gradienten
- lange Säule
- „normale“ bis hohe Flussrate
- 1.8 um Partikel und 2.7 um Poroshell

Partikel- / Matrix-haltige Proben:

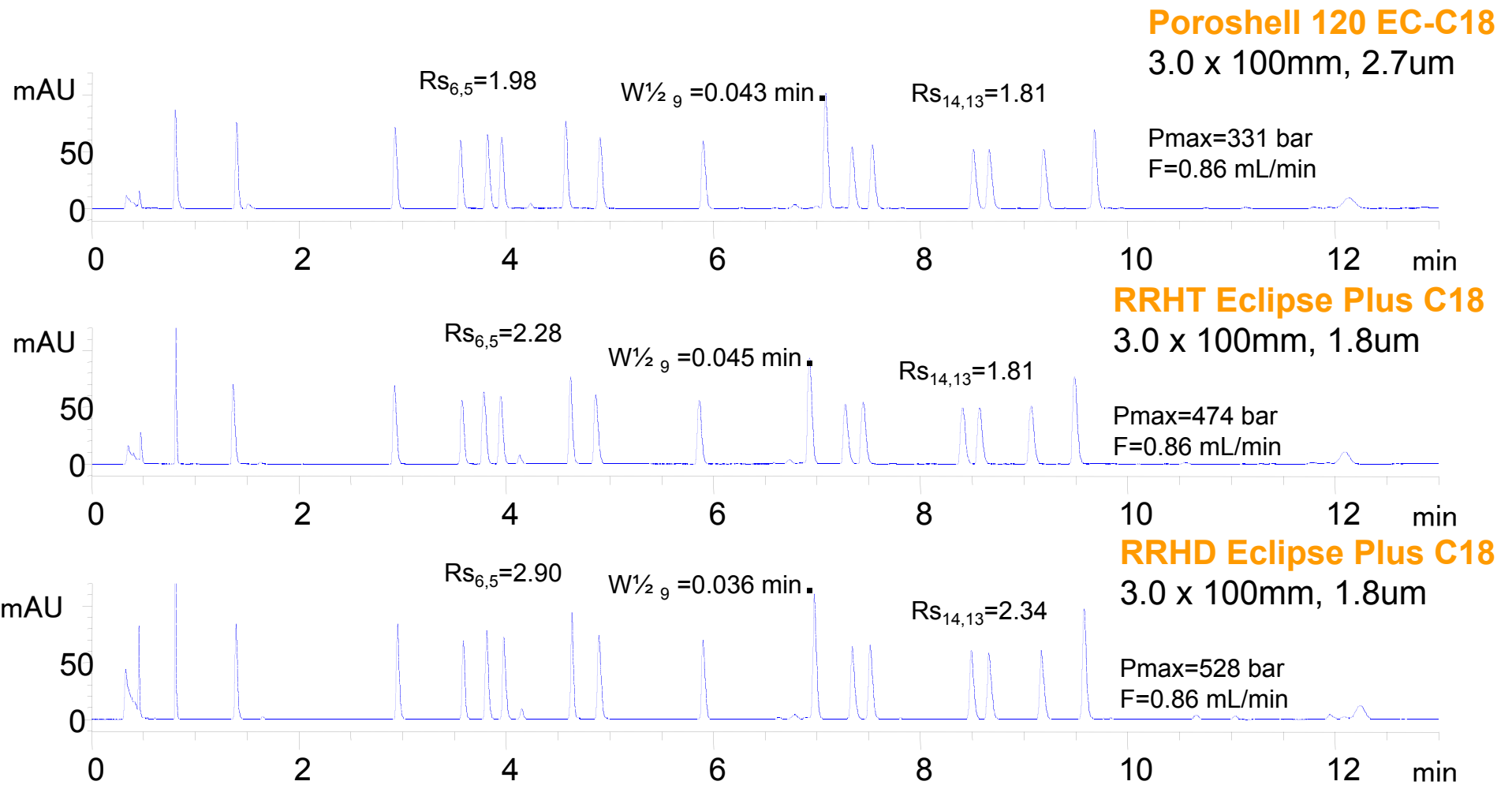
- 2.7 um Poroshell
- für Proben die wahrscheinlich die Fritten und Zwischenpartikelplätze blockieren würden und für schnelle Analysen
- Maximierung der Auflösung bei moderatem Druck

Wie unterscheiden sich Agilent sub2 micron Säulen?

Alle Säulen enthalten die identischen Partikel, sie sind aber in unterschiedliche Hardware gepackt. Die Selektivität ist also identisch!



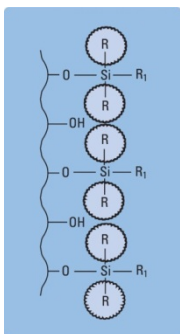
Selektivitätsvergleich: Sub 2µm vs. Poroshell 120 17 Aminosäuren mit 1290 Infinity



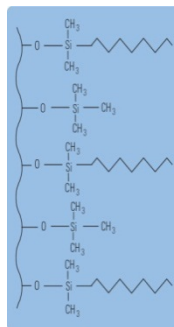
Kurzform: ZORBAX Säulenauswahlhilfe

	Fast Analysis	High Rs (N)	400 bar LC "Fitness"	600+ bar UHPLC "Fitness"	Scalability of Particle 1.8, 3.5um etc.	ID's 4.6, 3.0 & 2.1 mm	Dirty Samples?
Kartuschen 400 bar	ja	ja	ja	nein	ja	ja	möglich
RRHT 600 bar	ja	ja	möglich < 50 mm	möglich	ja	ja	möglich
RRHD 1200 bar	ja	ja	nein	ja	ja	nein 3.0 & 2.1	möglich

Probenvorbereitung

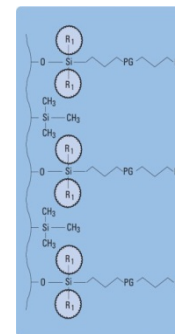


Stable Bond Familie

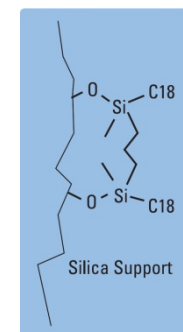


Eclipse XDB/Plus Familie

HILIC Plus



Bonus RP



Extend C18

Schutz RRLC Säulen vor zu hohen Drücken > 400/600 bar

The screenshot shows a software interface with several sections:

- Flow:** A control knob set to 0.400 mL/min.
- Solvents:** Two solvent channels, A and B. Channel A is set to 68.0% H2O. Channel B is set to 32.0% ACN.
- Stoptime:** Radio buttons for 'No Limit' and '13.00 min' (selected).
- Posttime:** Radio buttons for 'Off' and '1.00 min'.
- Pressure Limits:** A section with 'Min: 0.00 bar' and 'Max: 600.00 bar'. The 'Max' value is circled in red.

The screenshot shows the BinPump hardware interface. It displays:

- System status: 'BinPump' with a green 'Idle' indicator.
- Flow rate: 0.400 ml/min.
- Pressure: 444.53 bar, shown in a red box with a red vertical line through it, indicating a high-pressure warning.
- Other indicators: 'EMF' with a checkmark, and two solvent bottles labeled 'A1' and 'B1' with their respective flow rates (68.0 and 32.0).

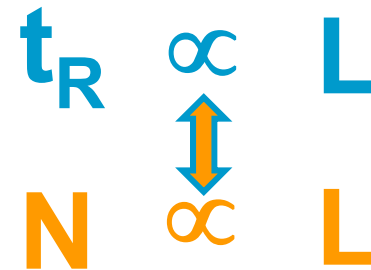
A red arrow points from the 'Max: 600.00 bar' setting in the software interface to the '444.53 bar' reading on the hardware interface.

Schnelle und hochauflösende Analyse – HPLC/UHPLC

Für schnelle und hochauflösende Analysen gelten bezüglich der RRHT, RRHD und Poroshell120 die selben Regeln.

Geschwindigkeit und Auflösung können nicht in einem Schritt maximiert werden. Auflösung braucht Zeit!

Gegensätzliche Forderung



Diese Zusammenhänge gelten für sub 2 Mikron und Poroshell120 Säulen gleichermassen.



Schnelle Trennungen – Reduktion der Säulenlänge

Säulenlänge (mm)	Effizienz (Bodenzahl) N (5 µm)	Effizienz (Bodenzahl) N (3.5 µm)	Effizienz (Bodenzahl) N (1.8 µm) (2.7 µm)
150	12500	21000	35000
100	8500	14000	23250
50	4200	7000	12000

Wie hält man die Effizienz konstant?

$$N = \frac{L_{c1}}{d_{p1}} = \frac{L_{c2}}{d_{p2}}$$

Diese Zusammenhänge gelten für sub 2 Mikron und Poroshell120 Säulen gleichermassen.

Schnelle Trennungen – Reduktion der Säulenlänge unter Erhalt der Effizienz

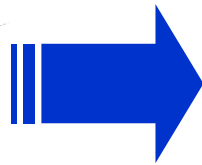
Reduktion der Säulenlänge



Reduktion der Partikelgröße



Säule 1: 4.6 mm x 150 mm, 5.0 µm



Säule 2: 4.6 mm x 50 mm, 1.8 µm, total porös

2.7 µm Poroshell 120

Dies gilt für sub 2 Mikron und Poroshell Partikel gleichermaßen.

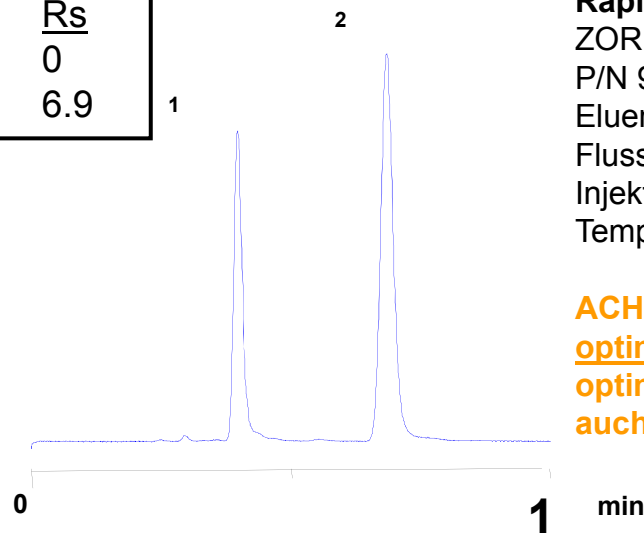


Agilent Technologies

Maximale Geschwindigkeit

Optimaler Einsatz von RRHT für HPLC/UHPLC

Peak	T_R	N	R_s
1	0.40	2991	0
2	0.69	4025	6.9



Rapid Resolution HT Säule (L1)

ZORBAX Eclipse XDB-C18: **4.6x30mm, 1.8µm**

P/N 923975-902

Eluent: 60% Methanol:40% Wasser,

Fluss: 1.5 mL/min

Injektion: 1µL,

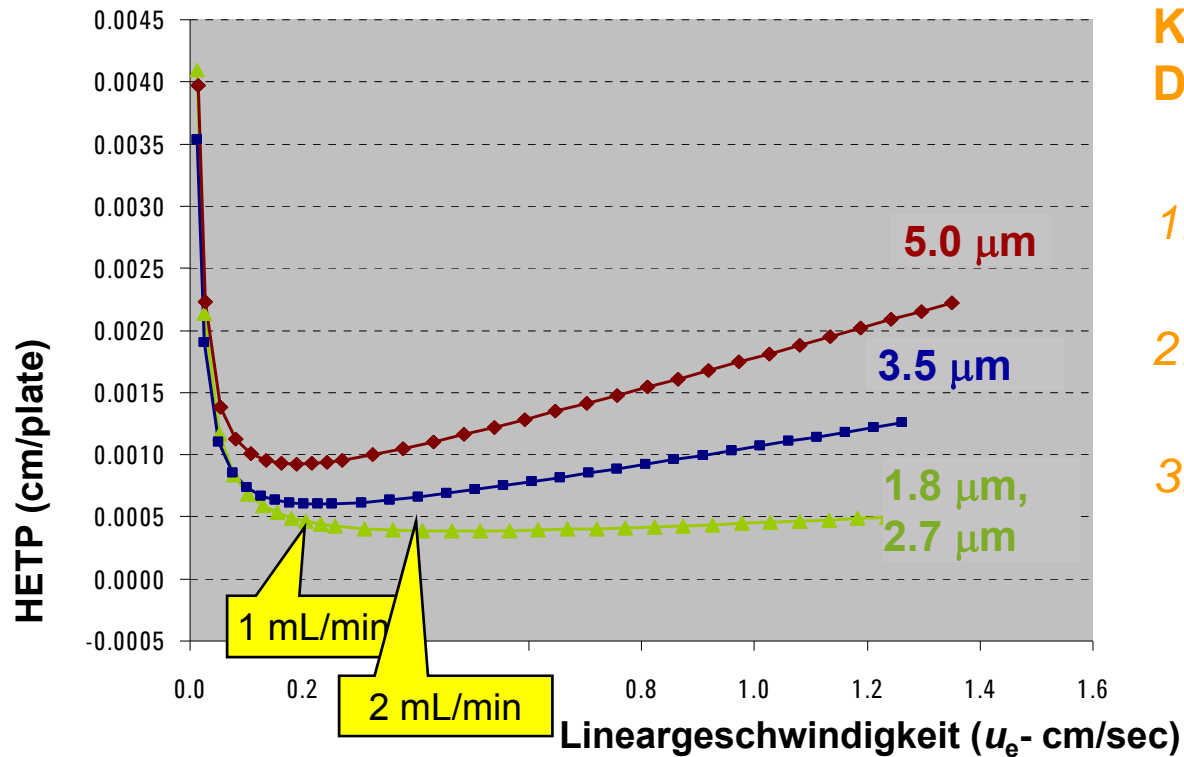
Temp: 25 C

ACHTUNG! optimiertes LC-System nötig
optimiertes Verzögerungsvolumen
optimiertes Extrasäulenvolumen
auch bei 400 bar Säulen

RRHT/D liefert bei minimiertem Verzögerungsvolumen maximale Geschwindigkeit für ultra-schnelle Analysen.

Verzögerungsvolumen kostet Zeit.

Beschleunigung durch Erhöhung der Flussrate unter Erhalt der Auflösung

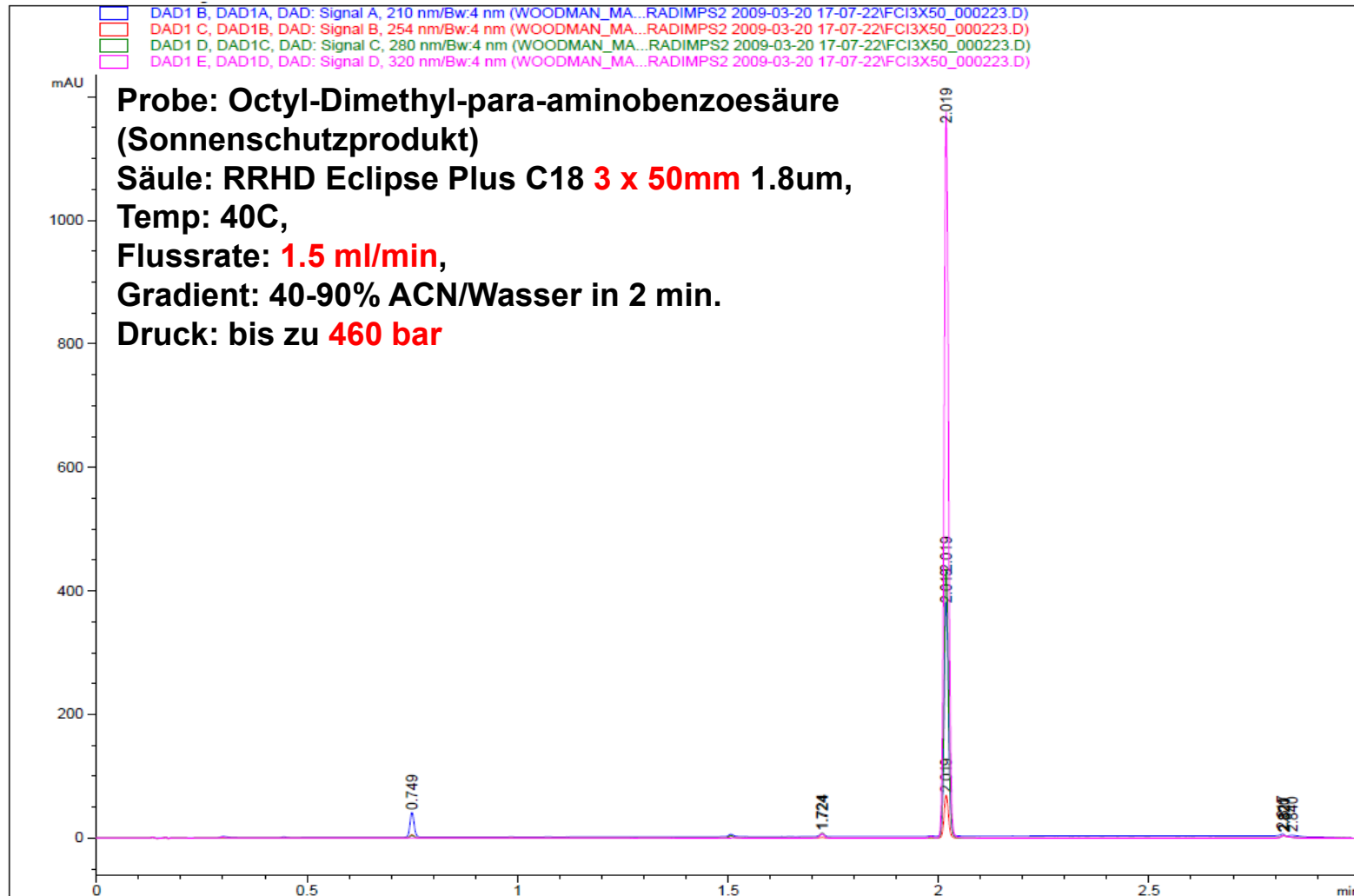


Kleingedrucktes der van Deemter Kurve

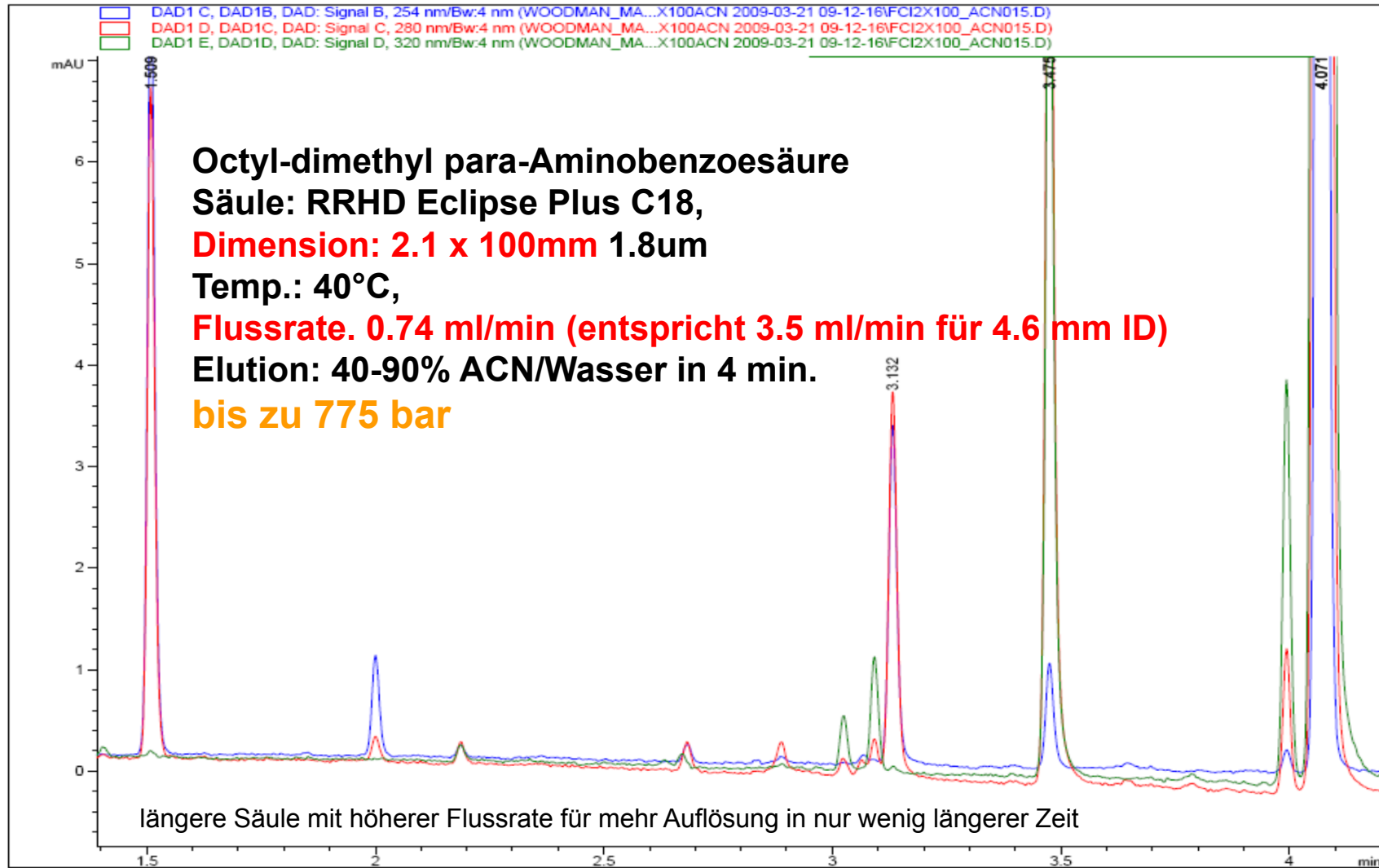
1. *Van Deemter* Kurven gelten nur für isokratische Läufe
2. *Van Deemter* Kurven sind substanzspezifisch
3. *Van Deemter* Kurven sind auch für sub-2- μm oder 2.7 μm teilporöse Partikel nicht horizontal, sondern nur flach.

- Flussratenerhöhung um 100%
- Reduktion der Laufzeit um 50%
- Reduktion der Gradientensegmente um 50%

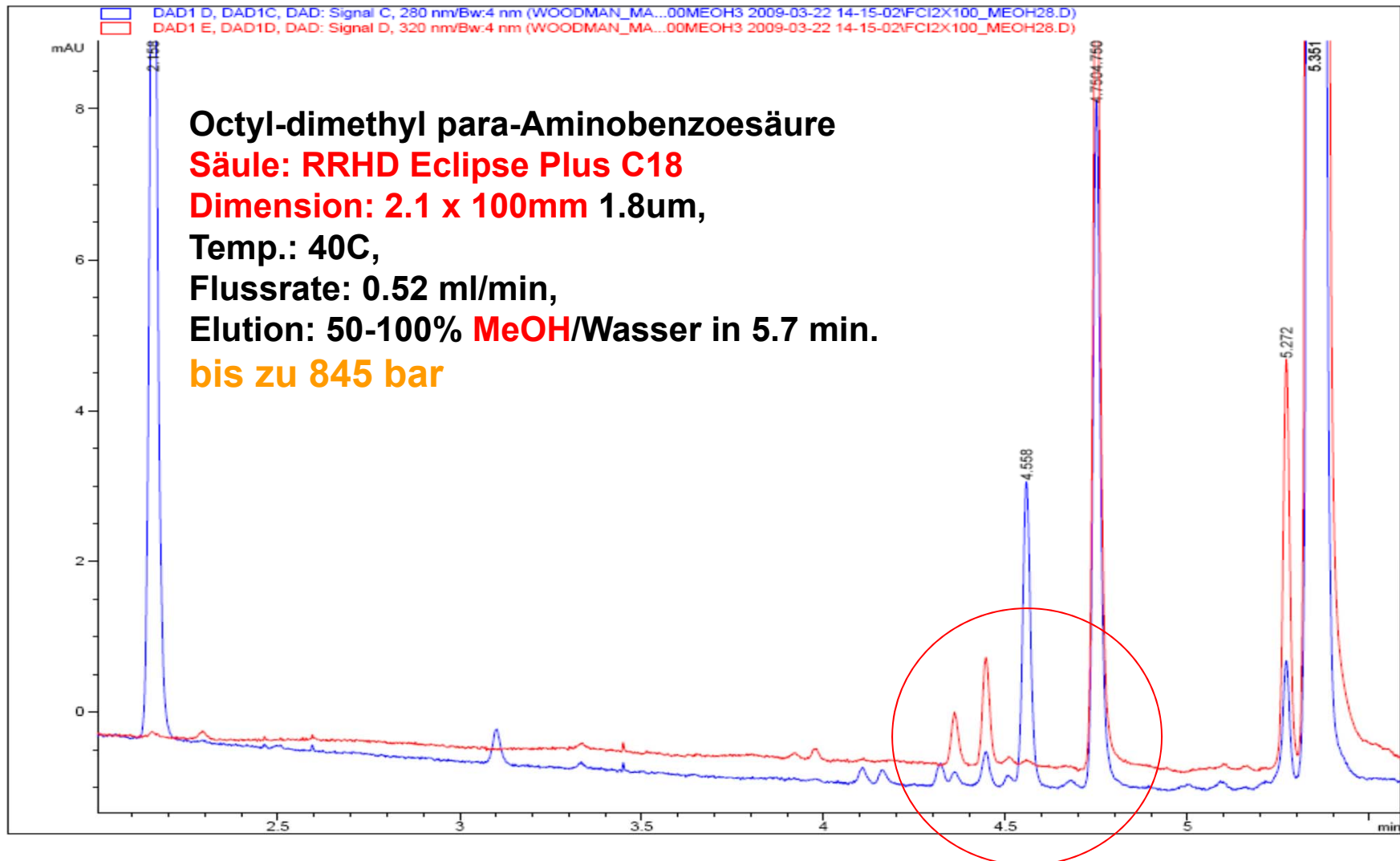
RRHD/RRHT: kurze 50mm Säulen mit typischen ACN-Gradientenbedingungen liegen unter 600 bar



Schnelle Trennung mit hoher Auflösung RRHD Säule und Agilent 1290 Infinity LC



Ausnutzen der Methanol Selektivität Rückdruck stellt kein Problem dar



Schnelle Analyse mit Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition Eclipse Plus C18

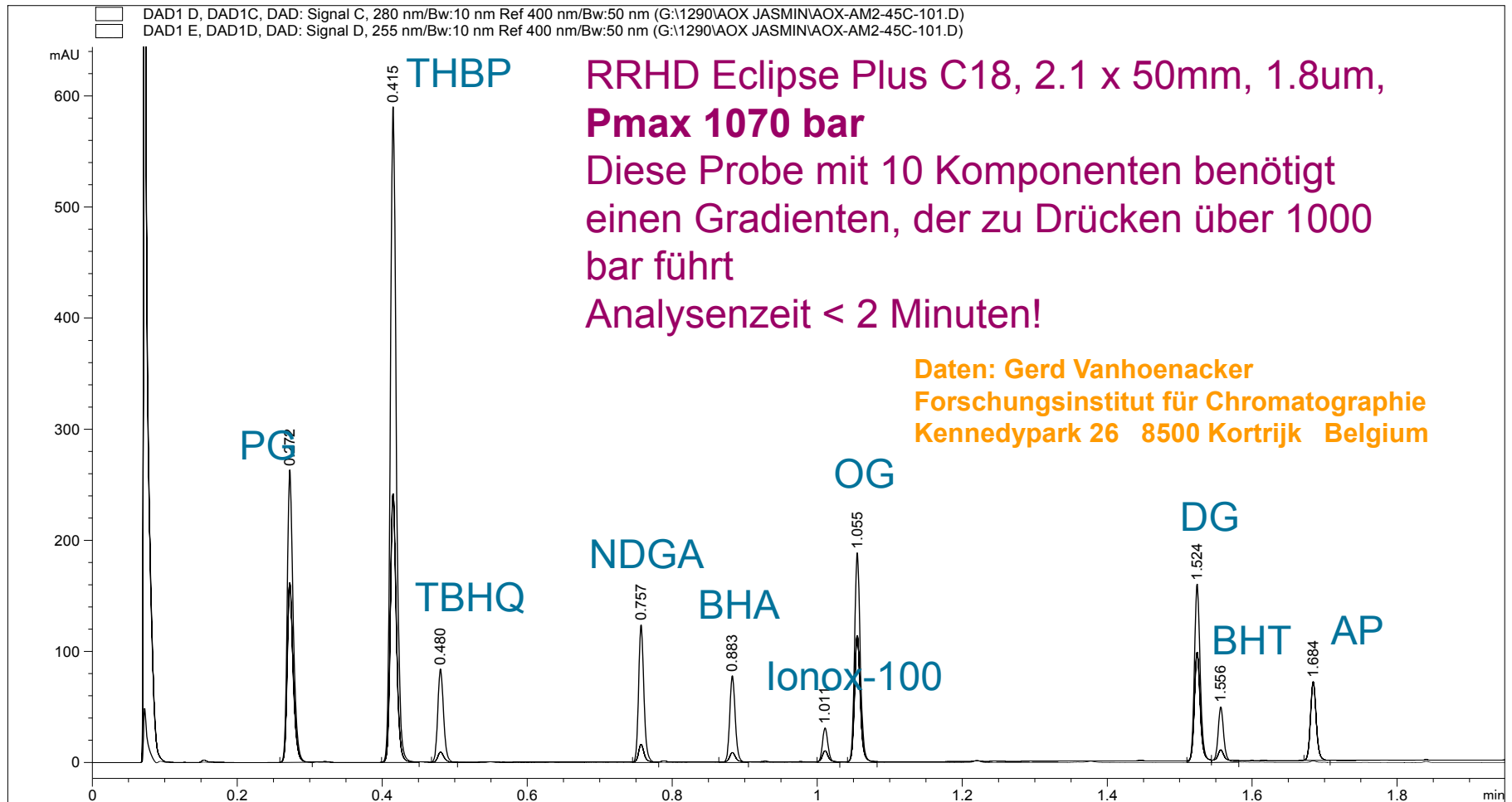
Methode

Säule	ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm
	(SN USDAY01001)
Mobile Phase	A=0.02% H ₃ PO ₄ , B=Acetonitril/Methanol 3/1
Flussrate	1.6 mL/min
Gradient	0-1.85 min 30-100% B
Injektionsvolumen	1 µL
Detektor	Sig=280/10 nm, Ref=400/50, 80 Hz Sig=255/10 nm, Ref=400/50, 80 Hz
Temperatur	45°C
Probe	Antioxidanten ca. 100 ppm

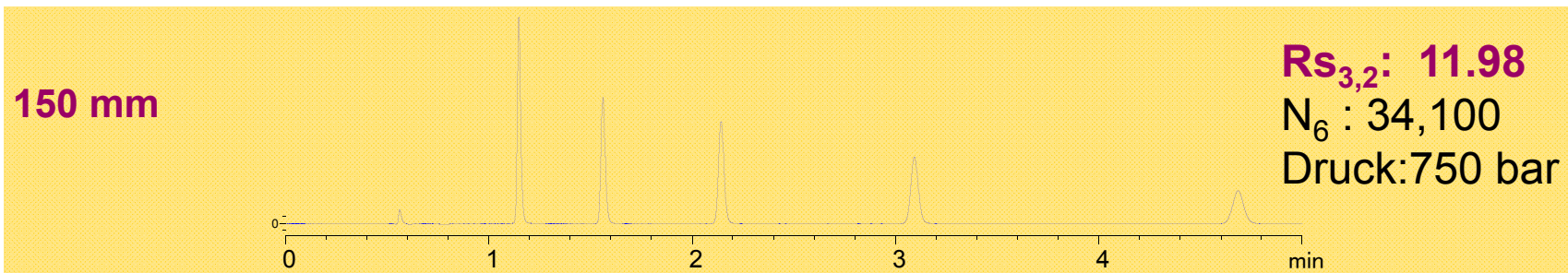
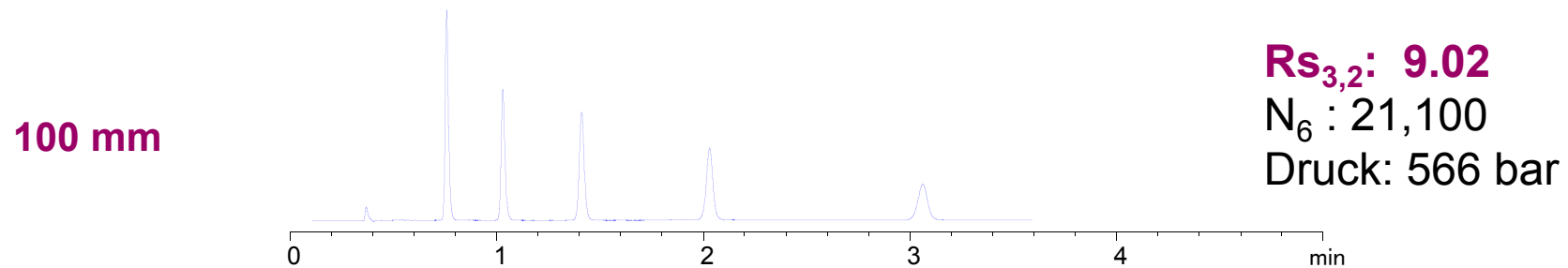
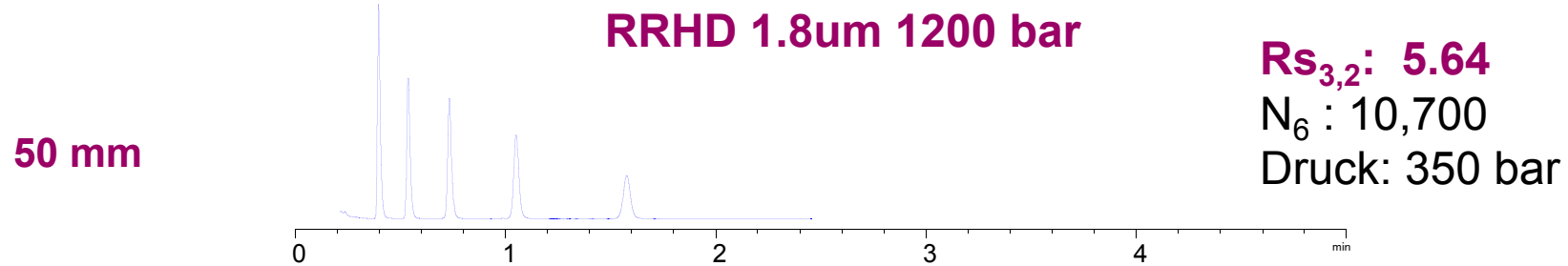
1.6 mL/min ist eine sehr hohe Flussrate für schnelle Trennungen

Daten: Gerd Vanhoenacker Forschungsinstitut für Chromatographie
Kennedyark 26 8500 Kortrijk Belgien

Schnelle Analyse: ZORBAX Rapid Resolution High Definition Eclipse Plus C18



Hohe Auflösung gegen Analysenzeit Höhere Säulenlänge

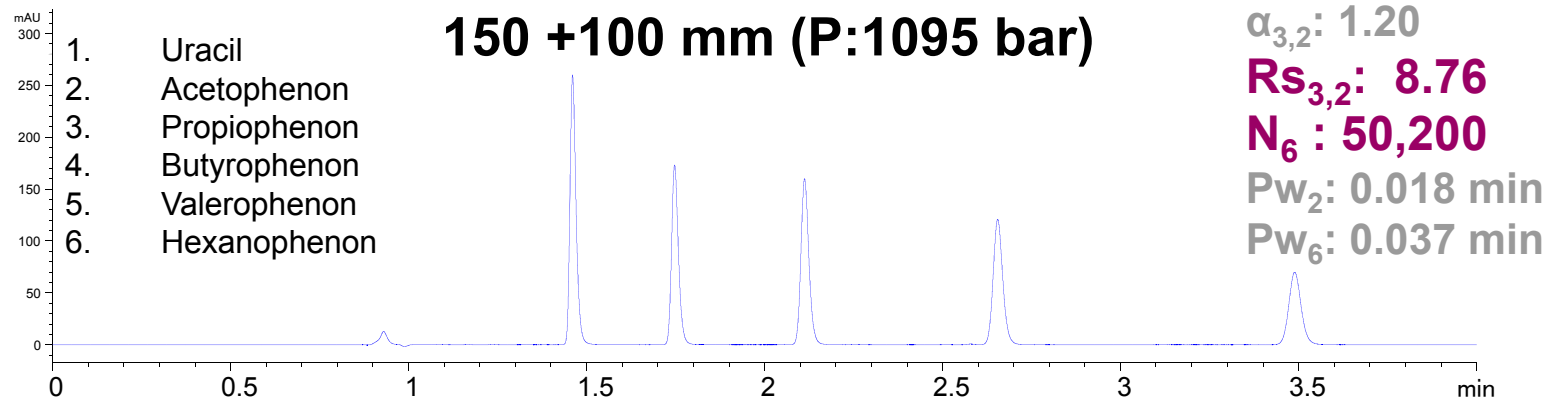
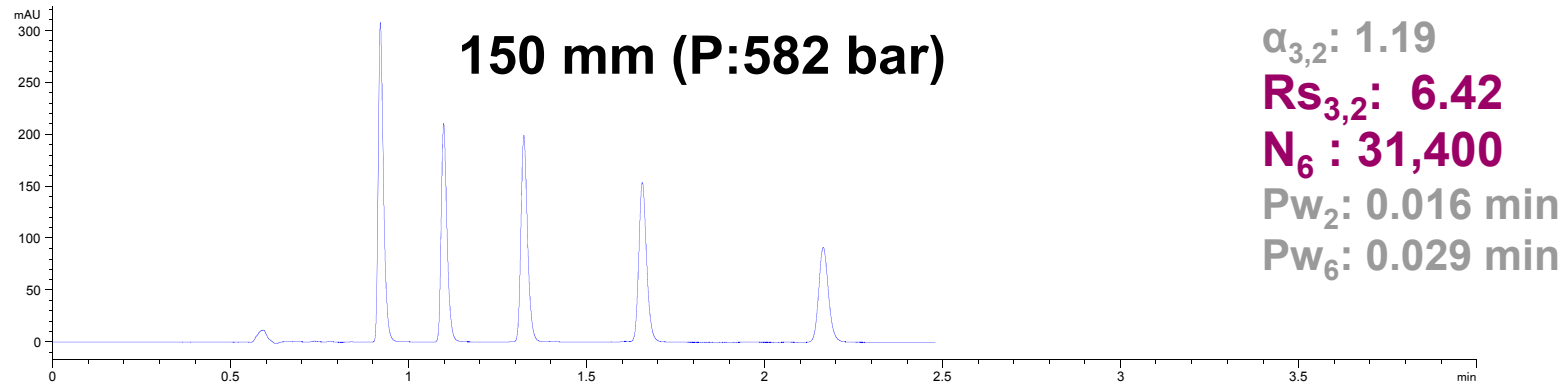


Säulen: RRHD SB-C18, 2.1 mm ID, Länge siehe Abbildung,
Mobile Phase: 60 %Wasser:Acetonitril, Flussrate: 0.5 mL/min, Temp: RT, Peaks: 1: Uracil, 2 Acetophenon, 3
pPopiophenon, 4 Butyophenon, 5 Valerophenon, 6 Hexanophenon

Zugewinn: Effizienz & Auflösung mit langen Säulen

150 + 100 mm = 250 mm 1.8 μ m @ 1100 bar

Hohe Auflösung Rs in 3.5 Minuten, 250mm, 1.8 μ m bei 1100 bar

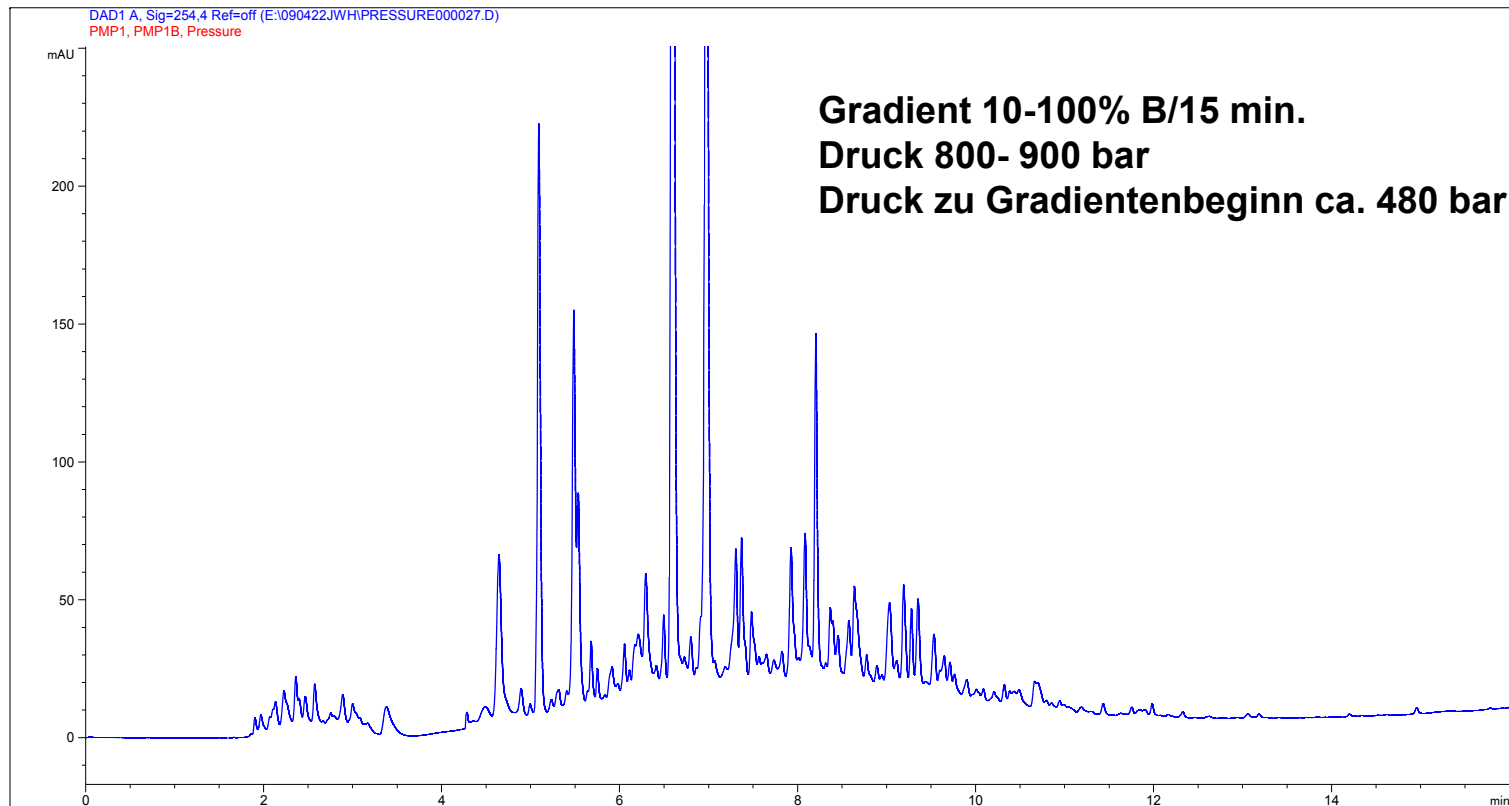


ZORBAX RRHD SB-C18, 1.8 μ m Säulen

Mobile Phase 25:75 Wasser:Acetonitril, Flussrate: 0.5 mL/min, Raumtemperatur

Hochauflösende Analysen: lange 1.8um Säulen

Lange Säulen in Serie geschaltet liefern max. Rs für komplexe Proben
Aromastoffe für geräucherte Lebensmittel



Mobile Phase A: Wasser B:Acetonitril, Flussrate=0.25 mL/min, Raumtemperatur,
Säule: ZORBAX RRHD, SB-C18, 2.1 x 150+100 mm, 1.8um



Agilent Technologies

Optimale Auflösung für Gradientenanalysen mit RRHD Säulen

$$R_s = \sqrt{N} \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \text{ k-Faktor}$$

α = Selektivität

N = Bodenzahl

k = Kapazitätsfaktor – isokratische Elution

K* = Retentionsfaktorsfaktor – Gradientenelution

$$k^* = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$

Einfache Optimierung:

t_G = Gradientenzeit

F = Flussrate

V_m = Säulenvolumen

(Änderung der Säulenlänge)

$\Delta\Phi$ = Gradientenbereich

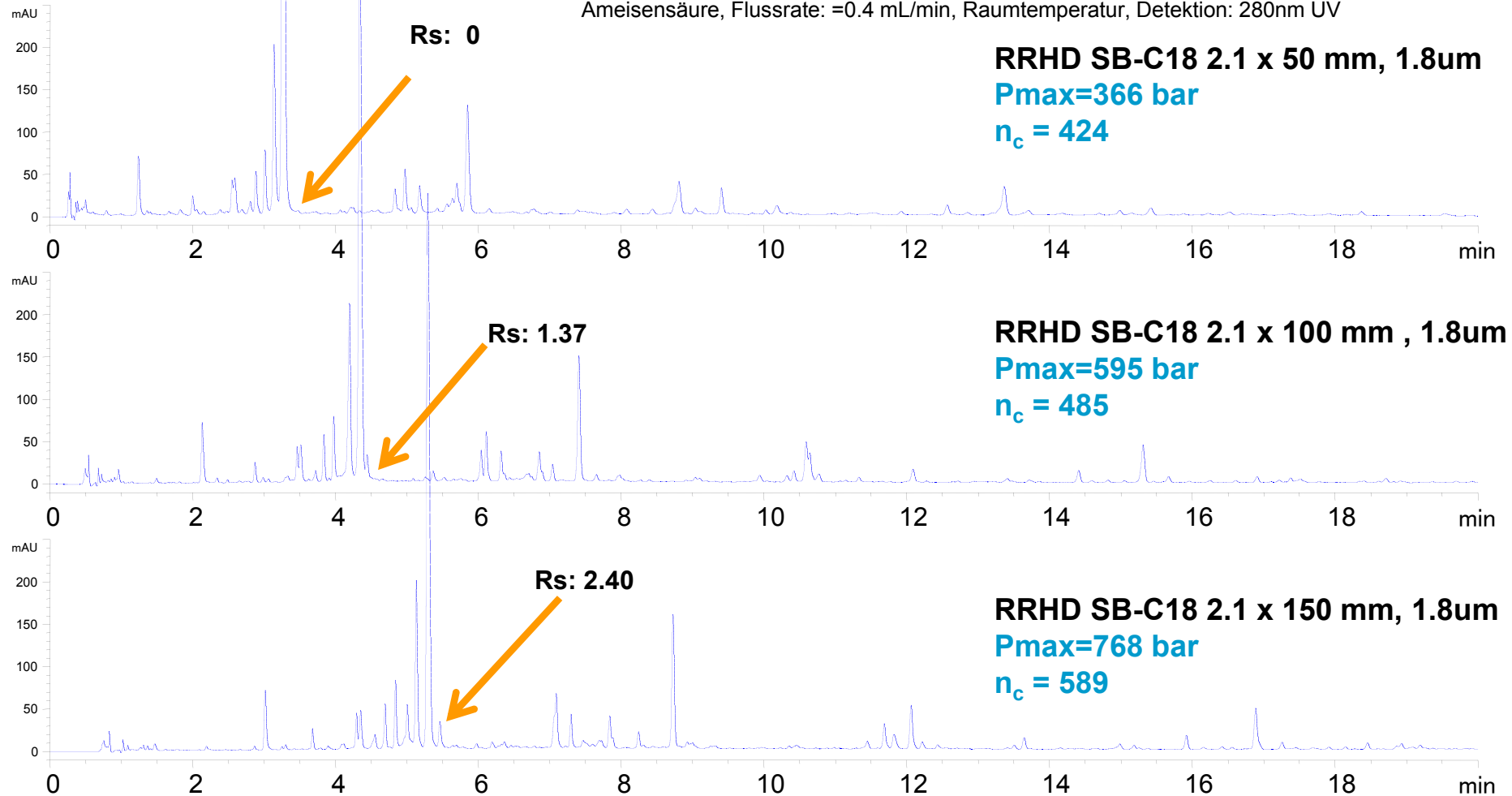
S = substanzspez. Konstante

optimal anwendbar für Säulen im Längenbereich von 50 – 150mm.

Analyse: Süssholzwurzel (Lakriz) auf RRHD Säulen 30 Minutengradienten für jede Säulenlänge

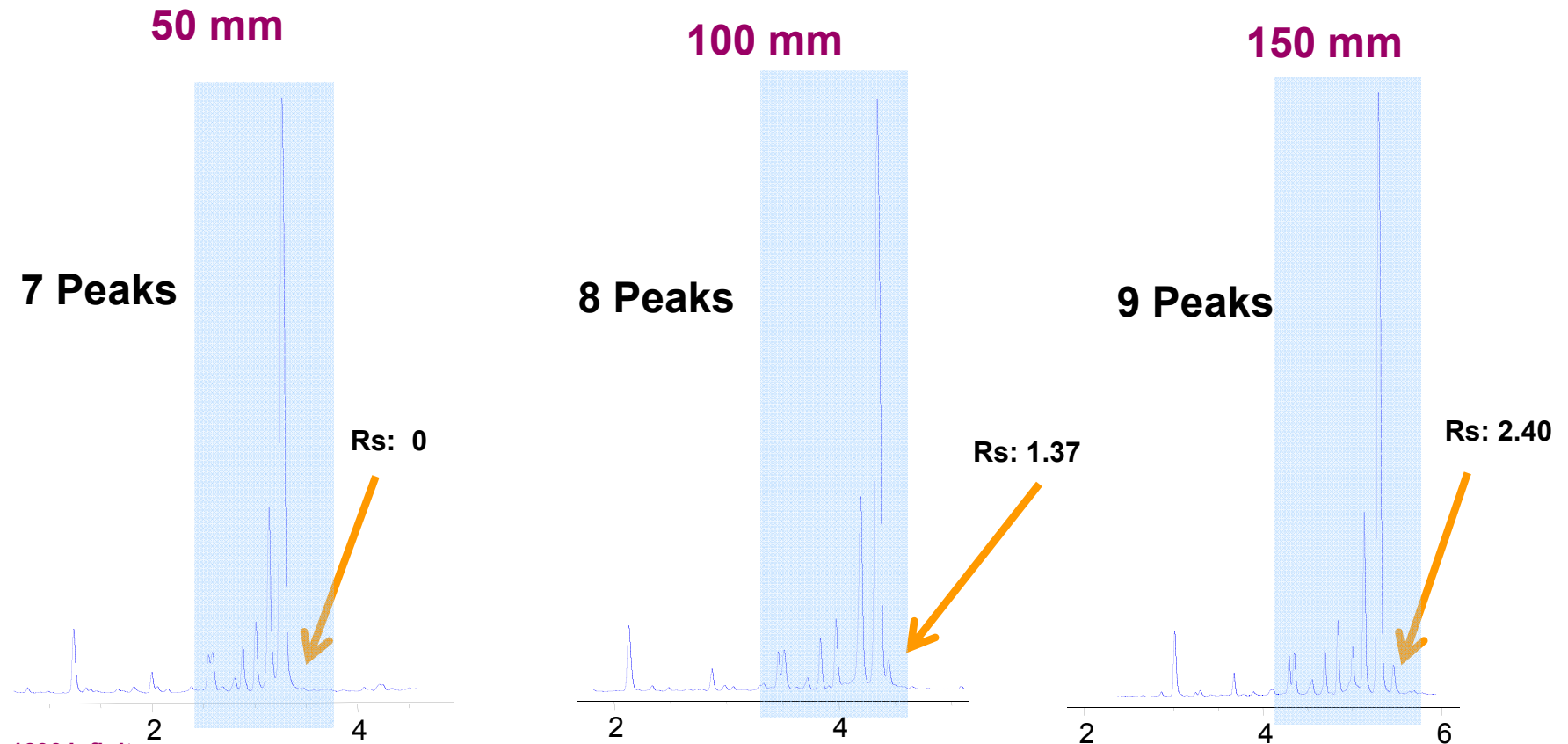
Instrument: 1290 Infinity

Mobile Phase: 10-100% B /30 min A: 0.1% Ameisensäure B: Acetonitril mit 0.1%
Ameisensäure, Flussrate: =0.4 mL/min, Raumtemperatur, Detektion: 280nm UV



Analyse: Süssholzwurzel (Lakriz) auf RRHD Säulen 30 Minutengradienten für jede Säulenlänge

Peakkapazität und Auflösung werden durch die Parameter Säulenlänge und Gradientenzeit optimiert.



1290 Infinity

Mobile Phase: 10-100% B /30 min, A: 0.1% Ameisensäure B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure, Flussrate=0.4 mL/min, RT, Detektion: 280nm UV



Agilent Technologies

Vergleich: Peakkapazität Säulenlänge und Gradientenzeit

$nc = t_g/w$ Basisline des letzten eluierten Peaks¹

Analyse: Süssholzwurzel

Gradienten-zeit \ Säulenlänge	10 Minuten	20 Minuten	30 Minuten
50	313	358	424
100	343	418	485
150	386	483	589

Farbig unterlegte Zahlen entsprechen vergleichbarer Peakkapazität

Diese Zusammenhänge gelten für sub 2 Mikron und Poroshell120 Säulen gleichermassen.

1. Neue, U.D., et. al, Advances in Chromatography, 41, 93 (2001)

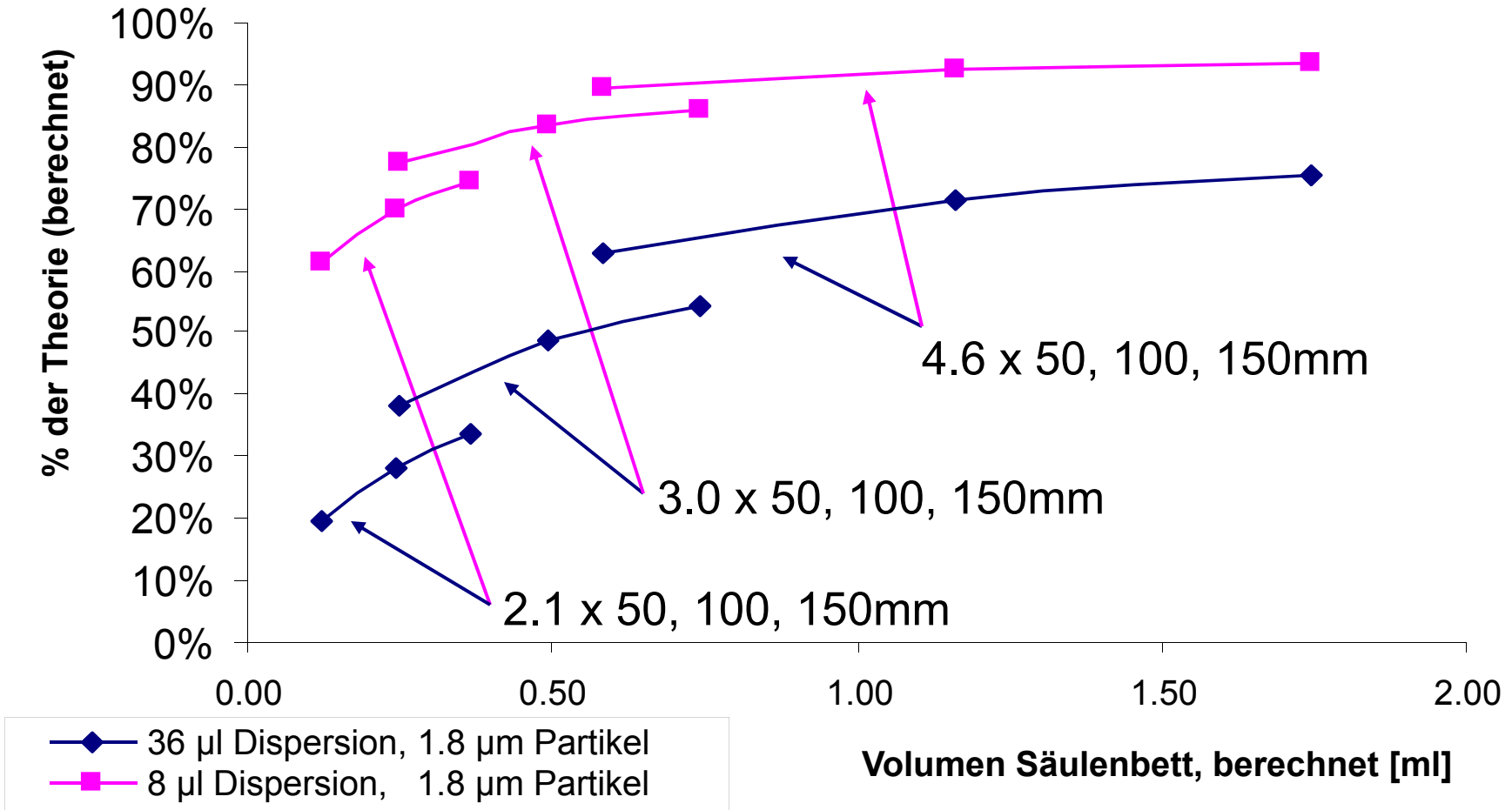
Dispersionsvolumen – Extrasäulenvolumen Einfluss auf die Trenneffizienz

Dispersion: *Aris-Taylor* Gleichung

$$\sigma^2 = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot F \cdot L}{24 \cdot D_m}$$

Relative Effizienz (Theor. = 100 %)

Bodenzahl, % der Theorie gegen Dispersion



Detektionszellen



Neues Design:
Temperatur entkoppelt
Spiraleinlass
Identifikationschip

13µl Standard Flusszelle:

- für maximale Sensitivität
- hohe Anforderungen an quantitative Analysen, zB. analytische Methodenentwicklung,QA/QC

2µl Micro Flusszelle:

- für maximale Auflösung
- ultra-schnelles semi-quantitatives Arbeiten, zB. Screening Experimente, HT LC/MS/UV

5µl Semi-micro Flusszelle:

- bester Kompromiss zwischen Sensitivität und Auflösung
- für gute quantitative und qualitative Resultate, zB Screening, HT LC/MS/UV, Early Formulation Studies

Dimension	Sensitivität*	Auflösung*
13 µl / 10mm	+++	+
5 µl / 6mm	++	++
2 µl / 3mm	+	+++

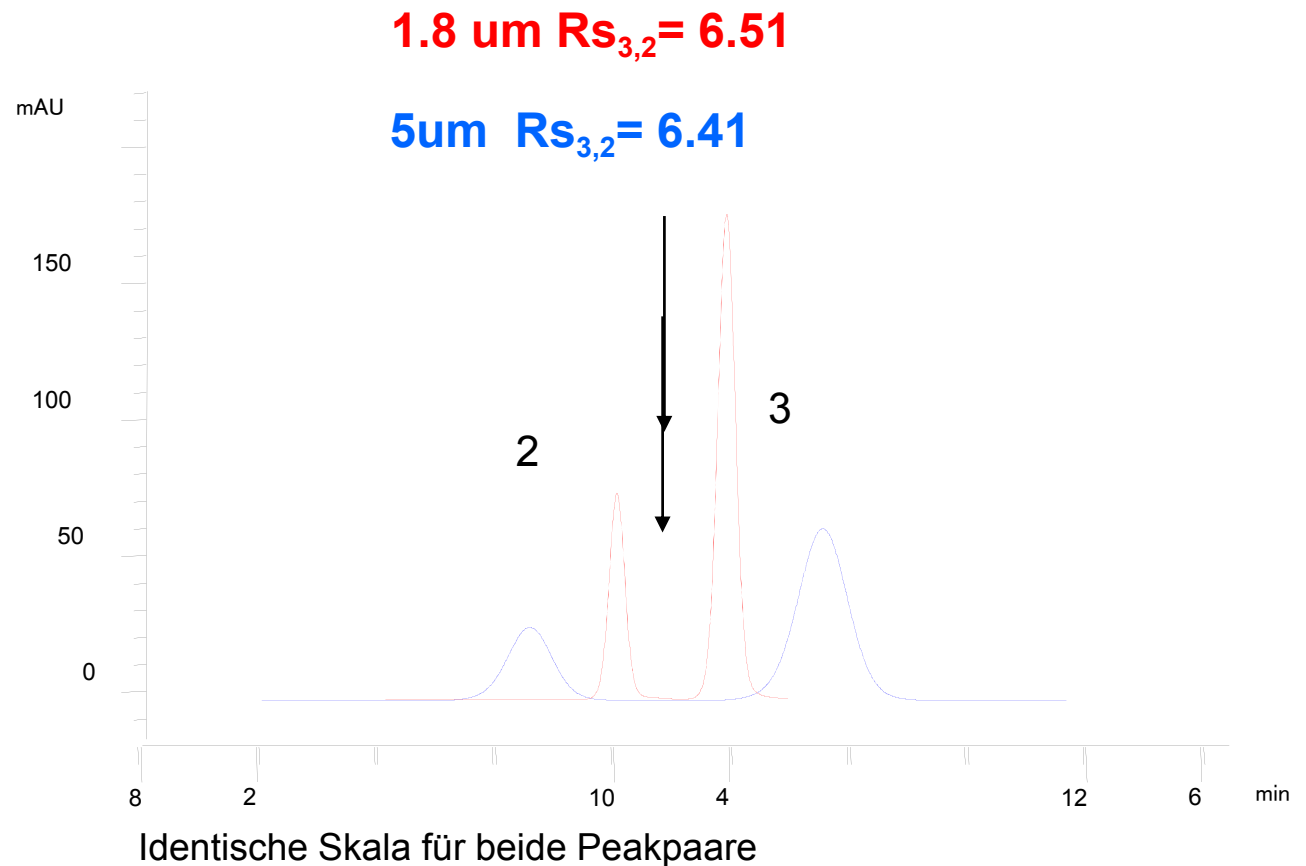
* abhängig von analytischen Bedingungen und Säulendimension

Erhöhte Sensitivität mit RRHT: Eclipse Plus C18

4.6 x 150 mm, 5 μ m
P=82 bar

4.6 x 50 mm, 1.8 μ m
P=208 bar

1. 2-hydroxy-4-methoxybenzophenon
2. Padimate-O
3. 2-ethylhexyl trans-4-methoxycinnamat
4. 2-ethylhexyl salicylat

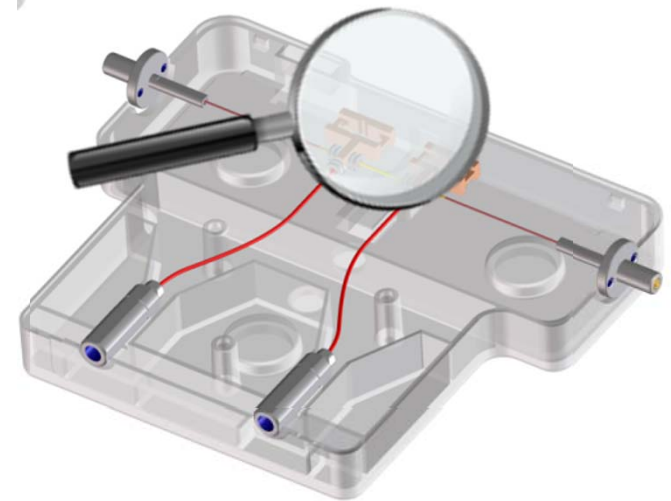


Säule: Eclipse Plus C18, Mobile Phase: A: Wasser, B: MeOH, (15:85) Temperatur: 25°C Flussrate: 1 mL/min.
Detektion: 310, 4 nm, 0.5 s response time, semi-micro Flusszelle, Probe: Sonnencreme

Detektionszelle 1290 Infinity

- *optischer Lichtleiter*

Unbeschichteter Lichtleiter
Lichtleiter (fused silica)



Hohe Lichttransmission durch innere Totalreflexion (TIR)

Vorteile:

- höchste Sensitivität (S/N) mit kleinstem Zellvolumen (dispersion effects)
- verlässliche und robuste Peakintegration (automated) durch praktisch keine Brechungsindexeffekte & Temperatureffekte (LM Temperatur)
- unbeschichtetes Fused Silica (keine speziellen Regeln zur Handhabung oder unerklärliche Basislinienseffekte)
- einfache Auswahl (eine Zelle für fast alle Applikationen)
- einfache Handhabung der Zelle/Zellaustauschs



Agilent Technologies

Martixbelastete Proben für 1.8 um Partikelsäulen

Filtration anspruchsvoller Proben erhöht die Lebensdauer und vermeidet Blockaden der Säule

- Minimierung der Partikel mit 0.2um Filter statt 0.45um Filter
- Einsatz von Uni-prep Filterfläschchen



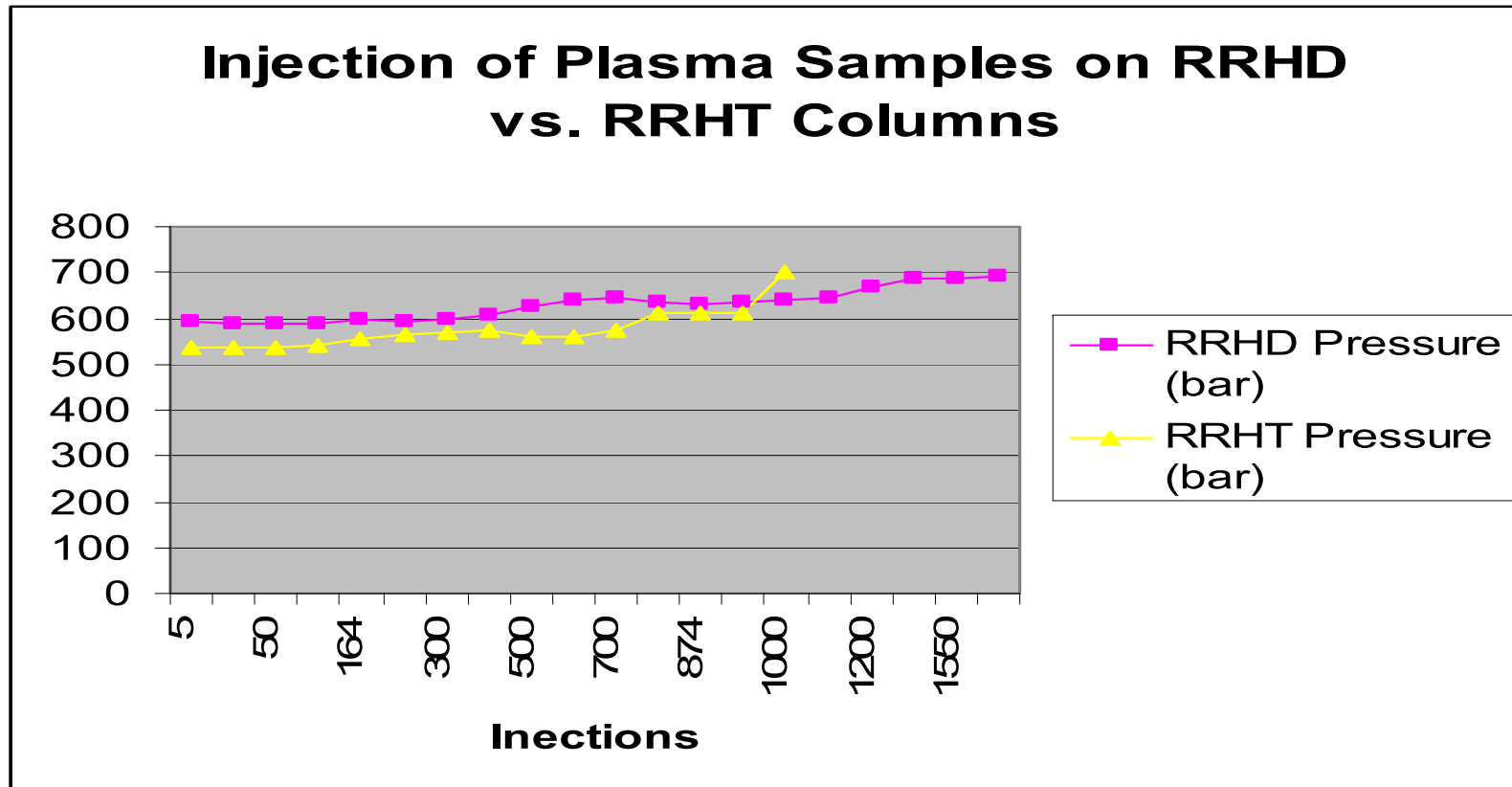
- SPE – Bond Elut unumgänglich in bestimmten Fällen

Agilent
Bond Elut Sample
Prep
Solutions



- HPLC grade Lösungsmittel für die Probenvorbereitung
- Filtration der Puffer
- Pufferaustausch: alle 24 bis 48 Stunden

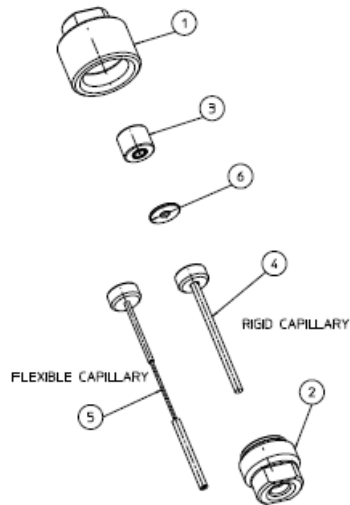
Lebensdauervergleich: Blutplasma (Protein gefällt) auf RRHD und RRHT



Probenvorbereitung:
Plasmaproteine gefällt mit ACN
zentrifugiert
filtriert durch 0.2um Filter

1290 Infinity Inline Filter für 1200 bar Systeme

Designed für minimales Carryover
 direkte Ankopplung an das Injektionsventil oder die Säule
 1200-bar Kompatibilität
 Totvolumen 1.3ul
 Filter 0.3um
 flexible Kapillaren



	1290 Infinity Inline Filter (0.3um)	5067-4638
1	Filter cap	Non orderable
2	Filter housing	Non orderable
3	Fitting insert	Non orderable
4	SST capillary rigid	5067-4637
5	SST capillary flexible	5067-4636
6	Filter frits (0.3um)	5023-0271 (5/pk)

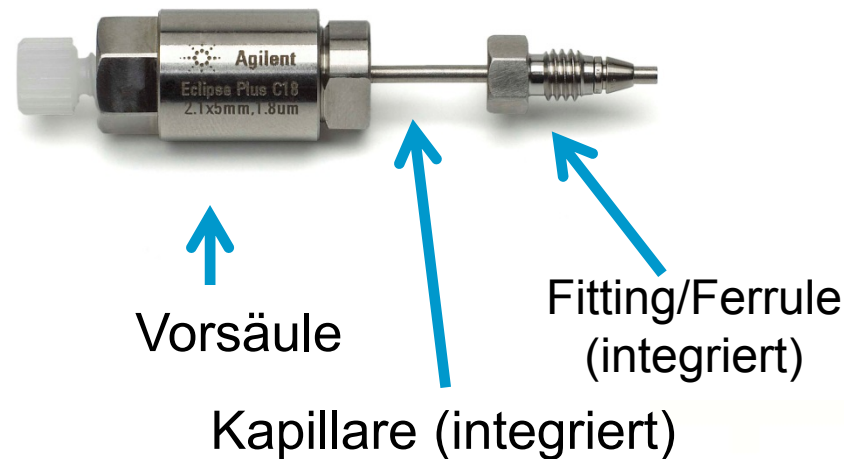
Sub 2 Micron ZORBAX Vorsäulen



ACHTUNG! Vorsäulen stellen ein Verzögerungsvolumen dar, das zur Verlängerung der Analyse beiträgt.

für 1.8µm: **EC-C18, EC-C8, SB-C18 & SB C8**

Dimensionen: 2.1mm, 3.0mm (in Kürze), 4.6mm ID x 5mm Länge



Die Agilent **Fast Guard für UHPLC** ist ein vollintegriertes Vorsäulensystem (one-piece guard) für den schnellen Wechsel und maximale Kompatibilität mit den Agilent Trennsäulen



Probe, Injektion und Elutionsmittel

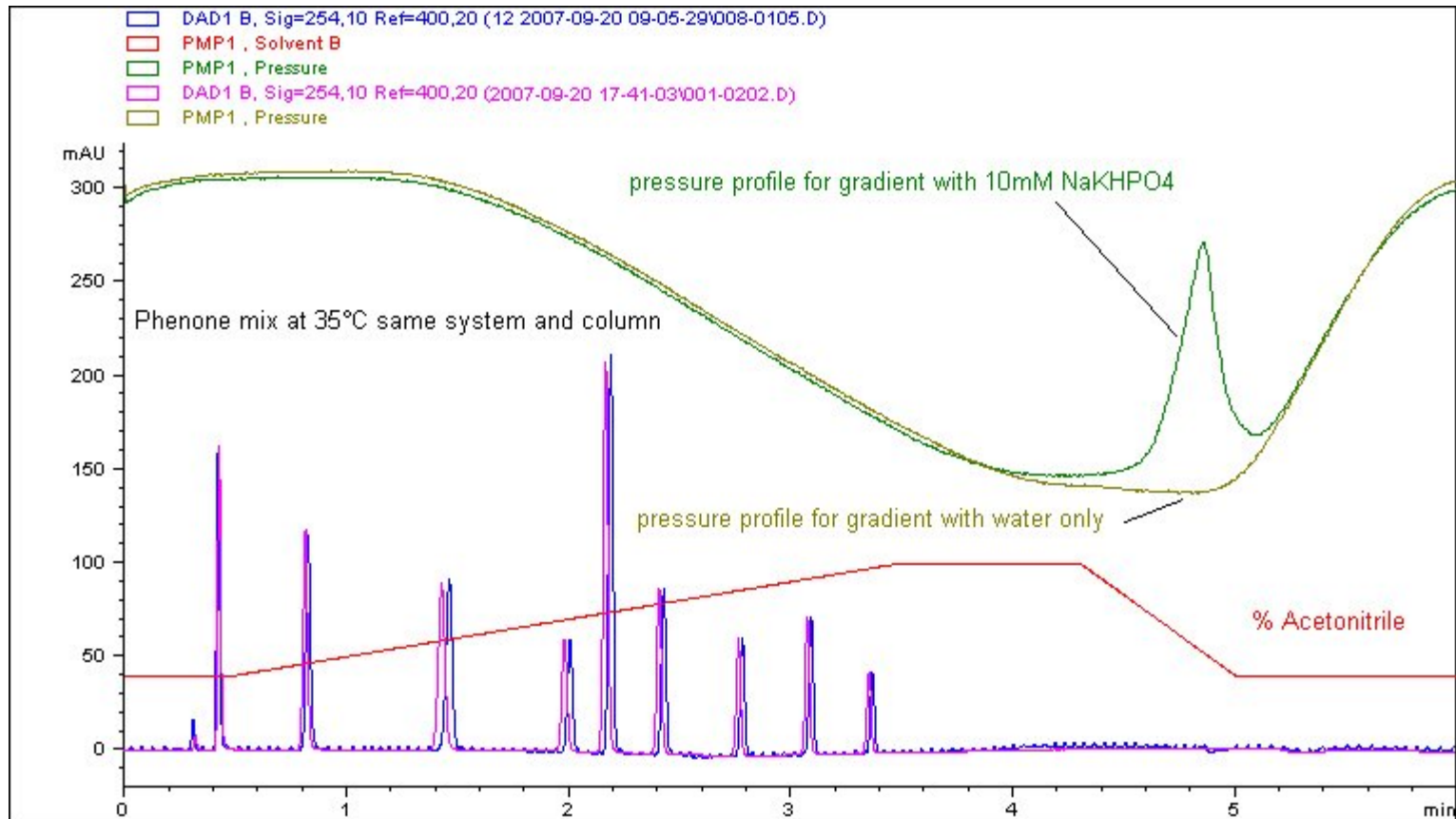
Löslichkeit der Probe im Starteluenten –
Gefahr eines Druckpulses in Falle einer Unlöslichkeit/Niederschlags

Wird die Probe aus einem Lösungsmittel höherer Viskosität oder Elutionskraft injiziert, kommt es zu **Peakverbreiterung und Deformierung insbesondere früheluerender Peaks** – deutlicher bei sehr schnellen Analysen.

Benutzen Sie reinste **organische Elutionsmittel**. ACN kann polymerisieren, insbesondere unter sauren Bedingungen. Aus Flaschen gelöstes Silikat, kann mit steigendem ACN-Gradienten ausfallen.

Ungenügende Löslichkeit des Puffers im organischen Lösungsmittel kann zu Säulenblockaden führen.

Pufferlöslichkeit in 100% organ. Solvent

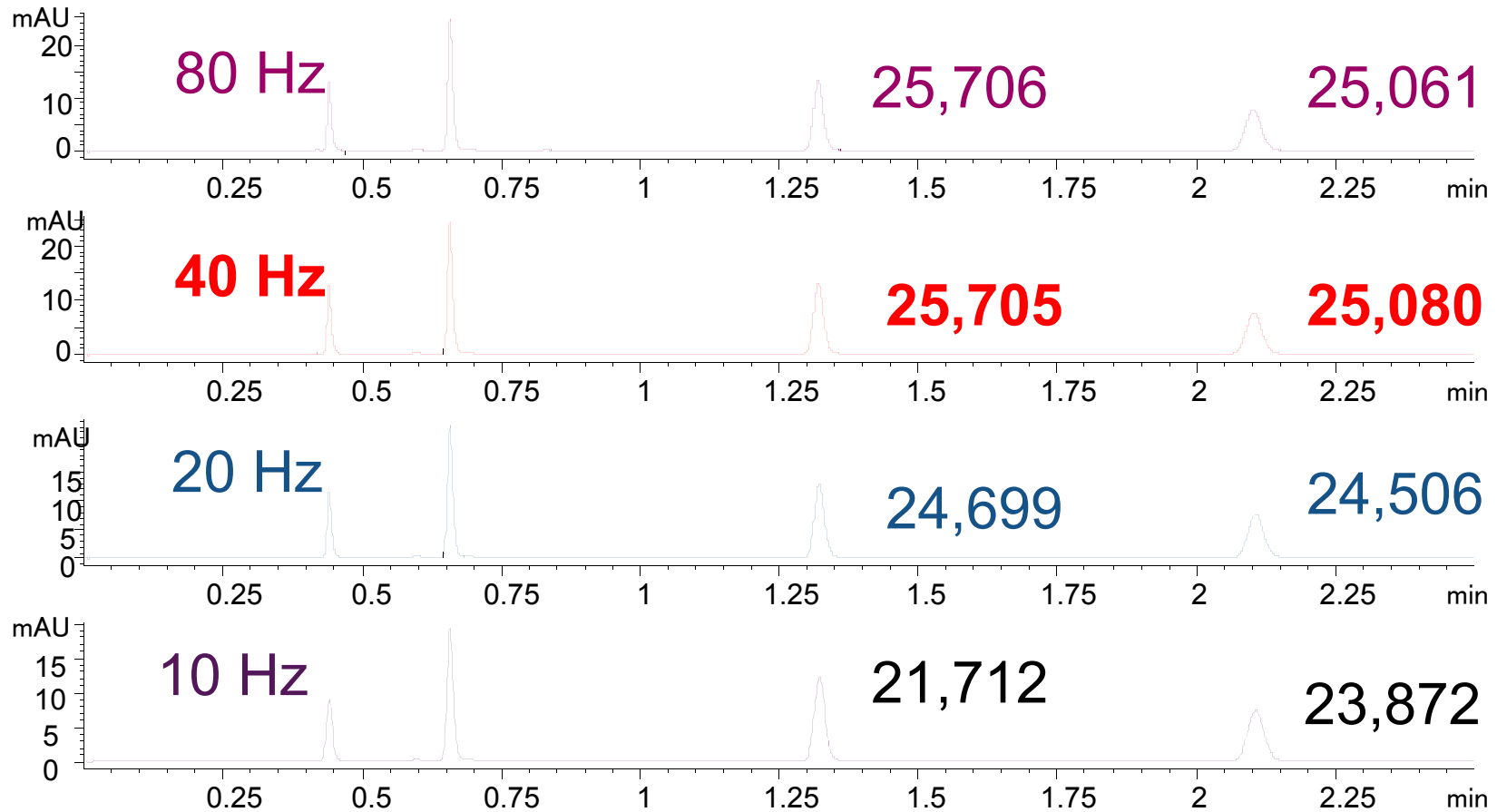




Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!!



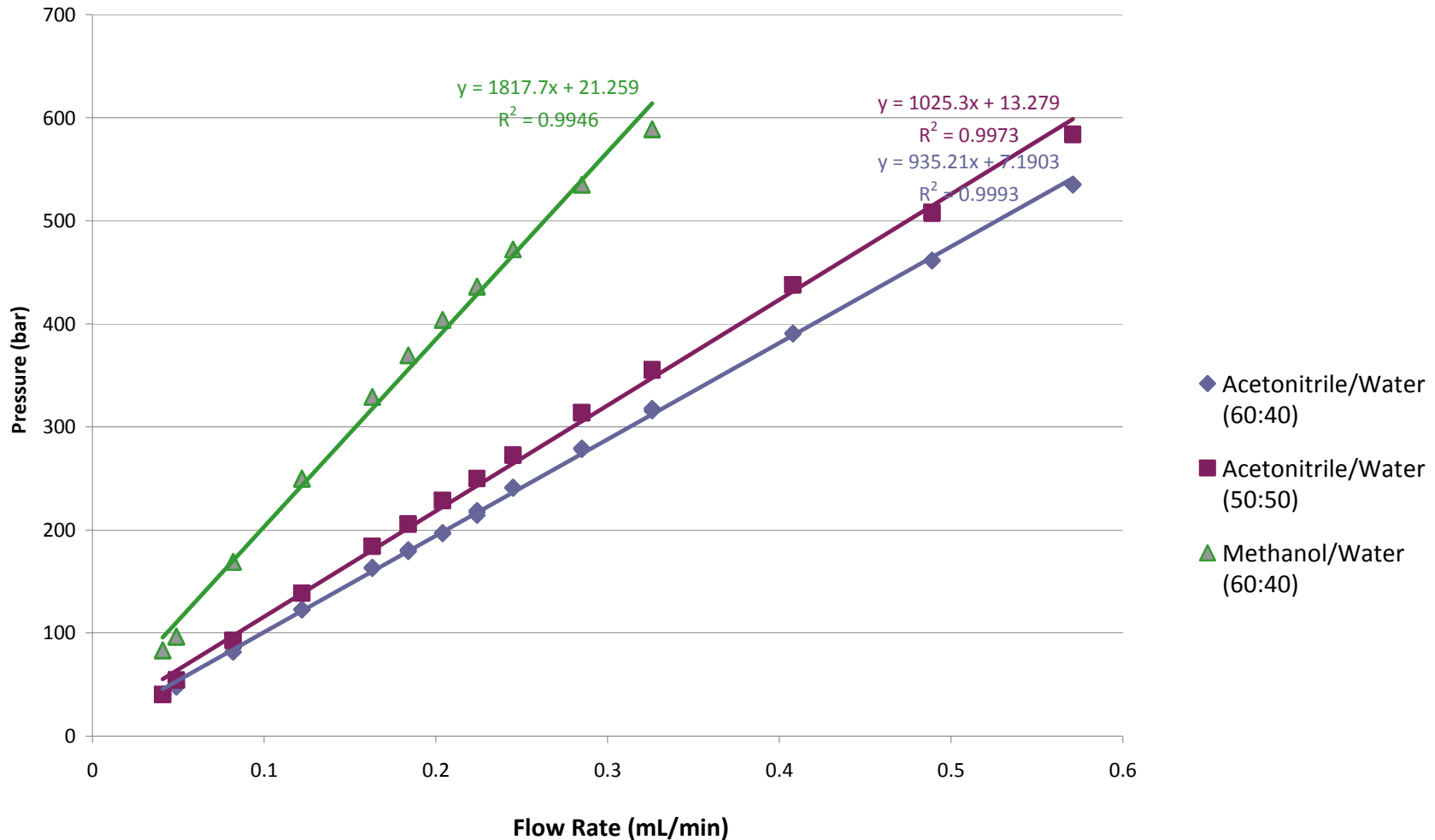
Effizienz: Poroshell 120 EC-C18 mit verschiedenen Datenaufnahmeraten



Säule: Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 100mm Instrument: 1200 SL 2ul Flusszelle
Flussrate: 2.00 ml/min Probe: 2ul Injektion of 3B Mobile Phase: 60:40 MeCN:Wasser

LC über 600 bar: RRHD Säulen

Agilent ZORBAX RRHT Eclipse Plus C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm; PN 959764-902,
SN USUXU01664, LN B08101



Matrixbelastete Proben für 1.8 um Partikelsäulen

Proben müssen partikelfrei sein –
einfache Probenvorbereitung – In-Line Filter

In-Line Filter: 01090-68702

Frits- 2 um:280959-904

Frits- 0.5 um:280959-907

5067-1551	RRLC In-line filter, 2mm, 0.2um filter
5067-1553	RRLC In-line filter, 4.6mm, 0.2um filter
5067-1555	Replacement frits, 2 mm, 0.2um, 10/pk
5067-1562	Replacement frits, 4.6 mm, 0.2um, 10/pk

1290 Infinity In-Line Filter

für 400 bar

für 600 bar

für 1200 bar

Säulenoptionen für die UHPLC

1. RRHD Säulen

- 1.8 µm Säulen für höchste Produktivität bis 1200 bar
- Uneingeschränkt einsetzbar für Agilent 1290 Infinity LC
- Kurze Säulen auch einsetzbar für Agilent 1200 RRLLC
- Einsatzbereich: höchste Auflösung in kürzerer Zeit
- Phasen: Eclipse Plus C18, SB C18, SB C8
- Dimensionen: 2.1 und 3 mm id x 50, 100 und 150 mm

Identische Selektivität
wie entsprechende
RRHT Phase!



Säulenoptionen für UHPLC

2. RRHT Säulen

- 1.8 μm Säulen für schnelle LC mit 600 bar Drucklimit
- Uneingeschränkt einsetzbar für Agilent 1200 RRLLC
- Einsetzbar für Agilent 1290 Infinity LC **bis 600 bar**
- Phasen: StableBond- und Eclipse-Familien, Bonus, Extend C18
- Dimensionen: 20 bis 150 mm, mit 20, 30, 50 und 75 mm Länge ideal für schnelle Trennungen mit hoher Auflösung
- 4.6, 3.0 und 2.1 mm ID

Identische Selektivität
wie entsprechende
RRHD Phase!



Säulenoptionen für UHPLC

3. Poroshell 120 Säulen

- Säulen für schnelle und hochauflösende LC zunächst mit 600 bar Drucklimit, später mit 1200 bar
- Uneingeschränkt einsetzbar für Agilent 1200 RRLLC
- Einsetzbar für Agilent 1290 Infinity LC **bis 600 bar**
- Einsatzbereich: schnelle und ultra-schnelle LC
- Phasen: StableBond C18 und EndCapped C18
- Dimensionen: 30 bis 150 mm, mit 30, 50, 75, 100 und 150 mm Länge ideal für schnelle Trennungen mit hoher Auflösung
- 4.6, 3.0 und 2.1 mm ID

Spezielle Probenvorbereitung für Poroshell 120?

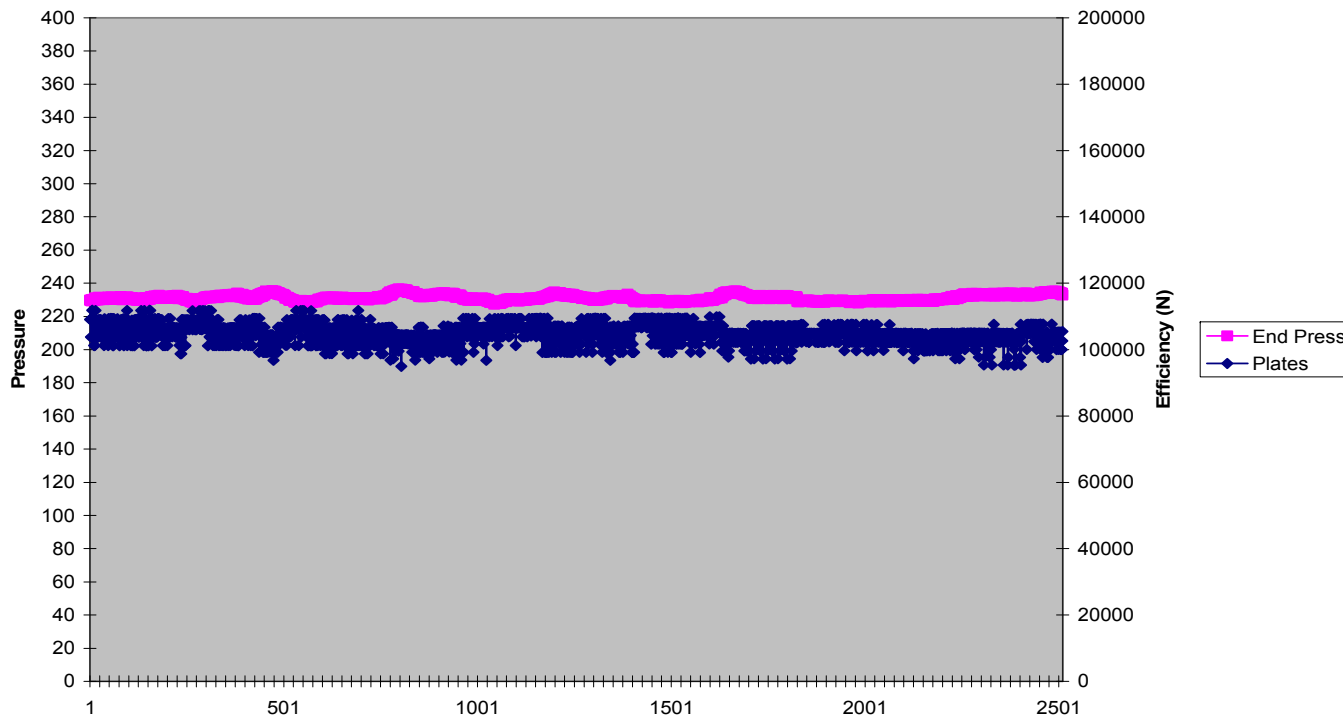
Keine spezielle Probenvorbereitung

Für Poroshell 120 Säulen muss die selbe Sorgfalt für Proben- und Elutionsmittel-vorbereitung getroffen werden, die auch für Säulen gepackt mit 3.5 um Partikeln durchgeführt wird. Diese Säulentypen haben identische Porengrösse der Fritten (2 um).



Poroshell 120 – minimiertes Verstopfungspotential 2 um Fritte - Blutplasma ungefiltert

Diflusinal in Plasma



Solvent A: Wasser w/0.1 % TFA
Solvent B: MeCN w/0.08 % TFA
Flussrate 1 ml/min 1 ul Injektion

Time	% B
0	20
0.5	90
0.6	90
1.1	20
2.5	20

Säule: Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 50mm, 2.7um LC: Agilent 1200 RRLC (SL)
Probe: CAN gefälltes Plasma: 2 Teile Plasma: 7 Teile 20/80 Wasser-MeCN w/0.1 % Formic Acid mit 1 Teil Diflusinal in 50/50 Wasser-MeCN 10 ug/ml (efinale Konzentration Diflusinal 1 ug/ml) schütteln und absetzen lassen 10 min.
Injektion Volumen: 1ul

nicht zentrifugiert / nicht filtriert

2.1 mm ID Poroshell 300 – hohe Flussraten für hohe Auflösung und schnelle Trennung

Poroshell liefert hohe Auflösung bei hohen Flussraten und damit schnelle Trennungen für Proteine und Peptide.

Ursache: reduzierter Diffusionspfad und verbesserter Massentransfer

Säule: Poroshell 300SB-C18
2.1 x 75 mm, 5 µm

Mobile Phase: A: 0.1% TFA
B: 0.07% TFA in ACN
Gradient: 5 – 100% B in 1.0 min.

Flussrate: 3.0 mL/min.

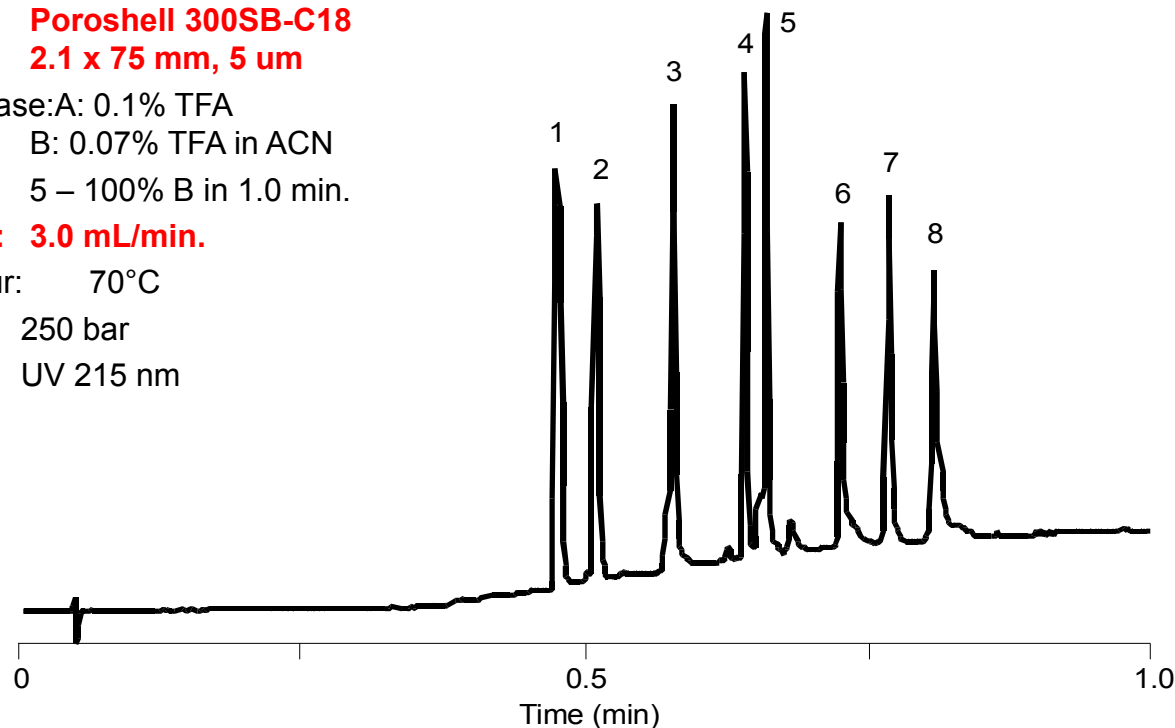
Temperatur: 70°C

Druck: 250 bar

Detektion: UV 215 nm

Probe:

1. Angiotensin II
2. Neurotensin
3. Rnase
4. Insulin
5. Lysozyme
6. Myoglobin
7. Carbonic Anhydrase
8. Ovalbumin



Poroshell 120 vs. Poroshell 300



Poroshell 120 für **Peptide Mapping**

- Peptidverdauproben von Proteinen oder monoclonal Antikörper
- Typische Gradientenverläufe lassen sich gut anwenden
- Flussraten von 0.5 mL/min oder höher für schnelle Analysen auf 2.1 mm ID Säulen
- Poroshell 120 EC-C18 für LC/MS Applikationen mit Ameisensäure

Poroshell 300 für **grössere Biomoleküle**

- Proben mit Polypeptiden
- Für sehr grosse Proteine
- Hohe Flussraten optimieren die Trenneffizienz (z.B. 1.0mL/min auf 2.1 mm ID Säulen)

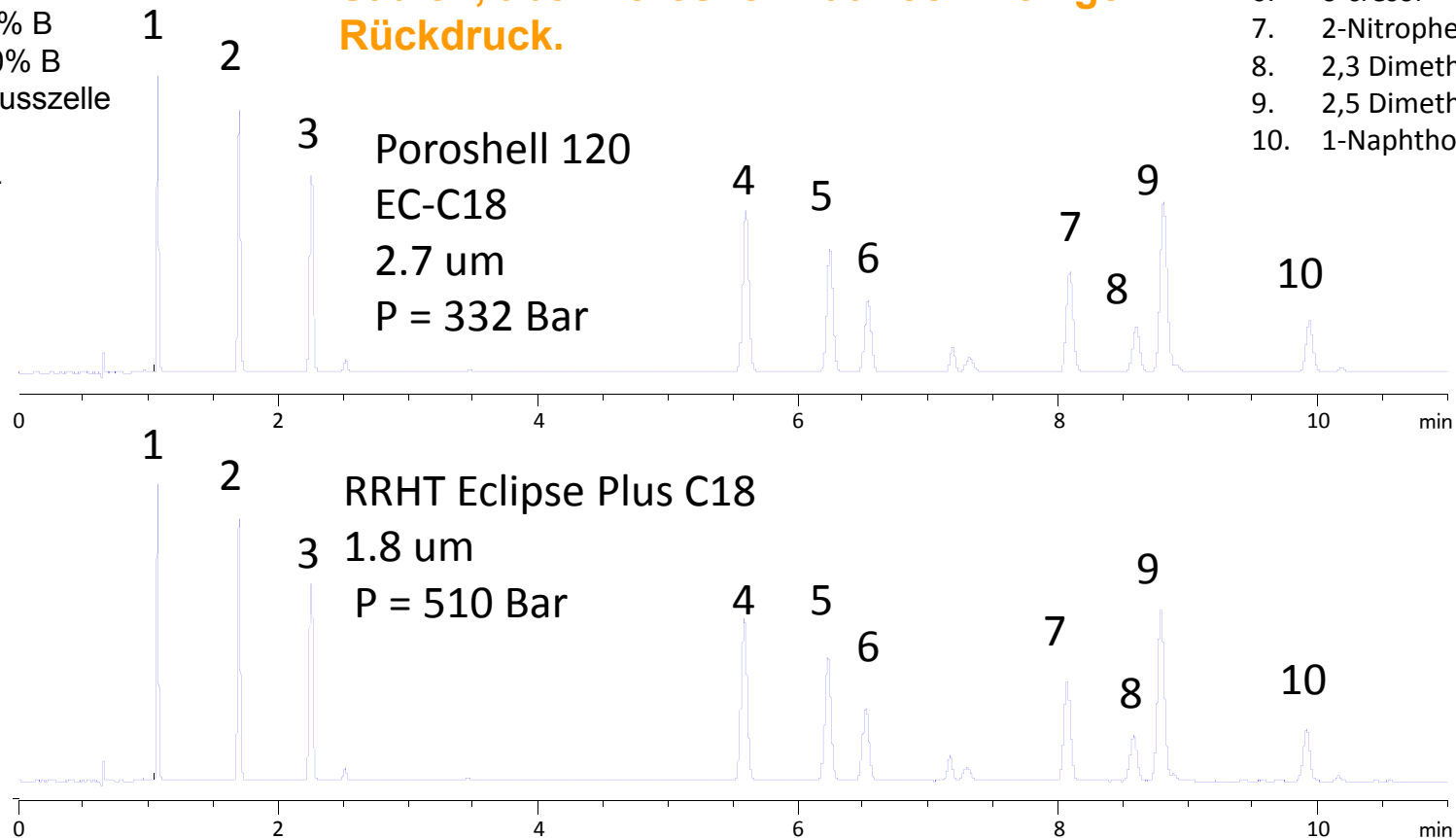
Selektivitätsvergleich Poroshell 120 EC C18 und Sub 2-micron RRHT Eclipse Plus C18

Säulen: 4.6 x 100 mm

A: Wasser 0.1% Ameisensäure
 B: Acetonitril 0.1% Ameisensäure
 Gradient 2 ml/min
 Initial 8 % B
 10 min 30% B
 275 nm 2mm Flusszelle
 Injektion: 10 uL
 Agilent 1200 SL
 40 °C

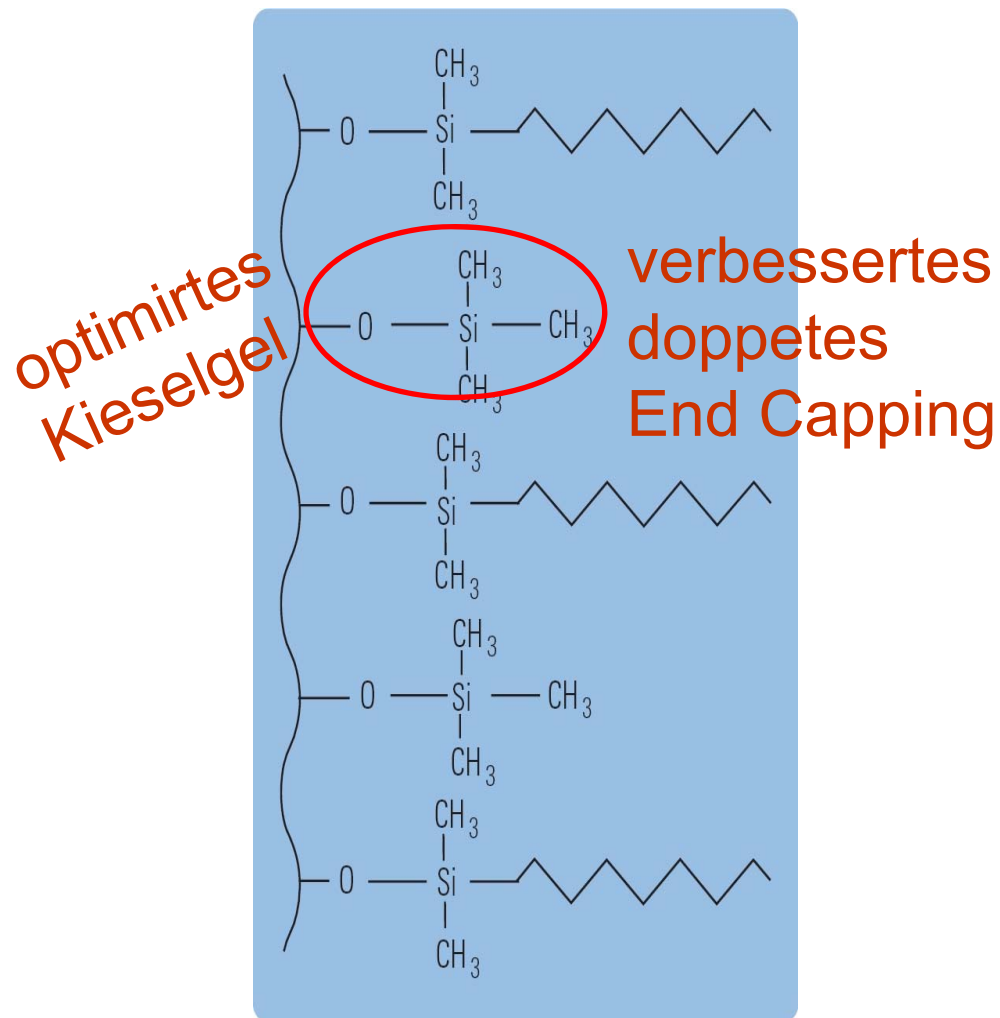
Agilent RRHT zeigt einen geringeren Rückdruck als die meisten sub 2um Säulen, aber Poroshell hat noch weniger Rückdruck.

1. Hydroquinon
2. Resorcinol
3. Catechol
4. 4-Nitrophenol
5. p-cresol
6. o-cresol
7. 2-Nitrophenol
8. 2,3 Dimethyl phenol
9. 2,5 Dimethyl phenol
10. 1-Naphthol



Poroshell 120 liefert 90% der sub 2-micron Effizienz und Rs bei geringerem Druck

ZORBAX Eclipse Plus

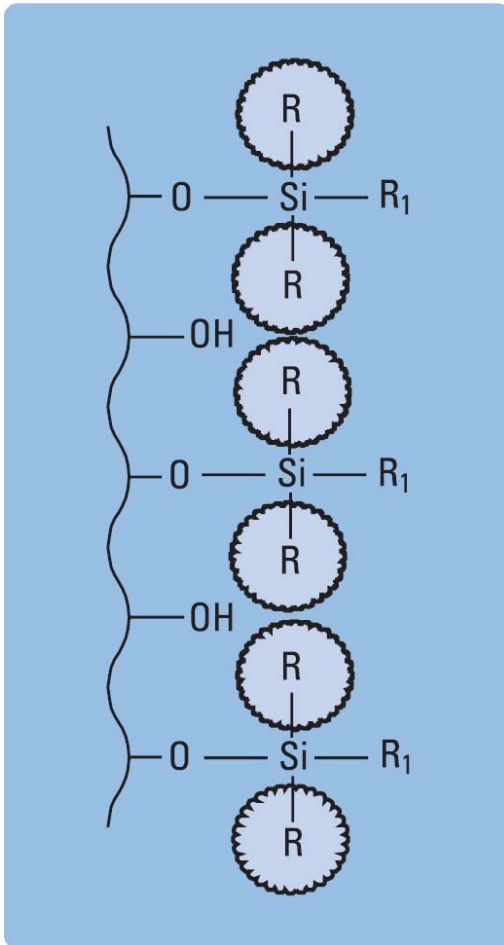


- breiter pH-Bereich: 2 - 9
- monofunktionelle Silane
- doppeltes Endcapping
- empfohlen als erste Wahl bei der Methodenentwicklung
- Eclipse Plus mit 95Å Porengrösse

Vorteil:

- hohes Endcapping **minimiert ionischen WW** -> **hohe Effizienz** für unterschiedlichste Substanzen u. auch für Basen im neutralen Bereich

ZORBAX StableBond SB



- Stark saurerer pH-Bereich: 1 - 8
- monofunktionelle Silane mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten (Diisopropyl bei C8, C3, CN, Phenyl und Diisobutyl bei C18)
- kein Endcapping - sterische Abdeckung restlicher Silanolgruppen
- Verfügbar in zwei Porengrößen: 80Å und 300Å

Vorteil:

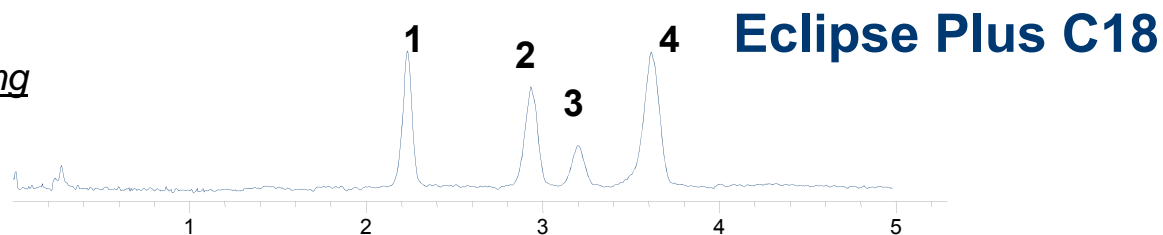
- alle restlichen Silanolgr. in ungeladener Form -> keine ionischen WW -> hohe Effizienz, auch für Basen/geladene Moleküle, im stark sauren Bereich

Methodenentwicklung: Selektivitätsunterschiede von ZORBAX RRHT/RRHD C18 Phasen

Voraussetzung für eine effiziente Methodenentwicklung sind verschiedene stationäre Phasen und Selektivitätsoptionen

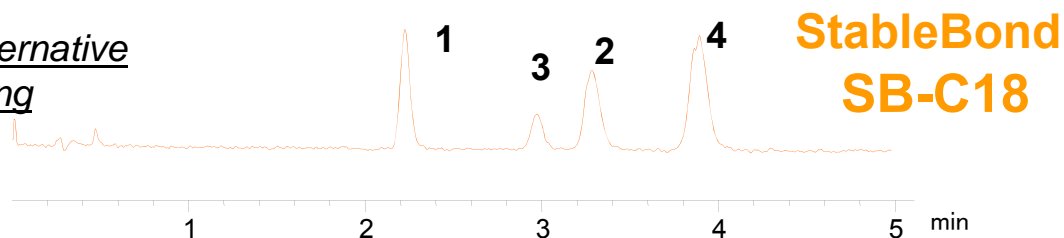
1. Wahl

Beste Auflösung
& Peakform



2. Wahl

Selektivitätsalternative
kein Endcapping



Säulen: RRHT 4.6 x 50 mm 1.8 um

Mobile Phase: (69:31) ACN: Wasser, Floustrate:1.5 mL/min., Temp: 30 °C, Detektor: Single Quad ESI positive mode scan
Probe:1. Anandamide (AEA), 2. Palmitoylethanolamide (PEA), 3. 2-arachinoylglycerol (2-AG),. Oleoylethanolamide (OEA)

Mehr Produktivität durch mehr Auflösung 1.8 um RRHD Säulen und 1290 Infinity LC

Schnelle Analysen mit komplexen Proben

Gradientenanalysen mit 4-10 Komponenten

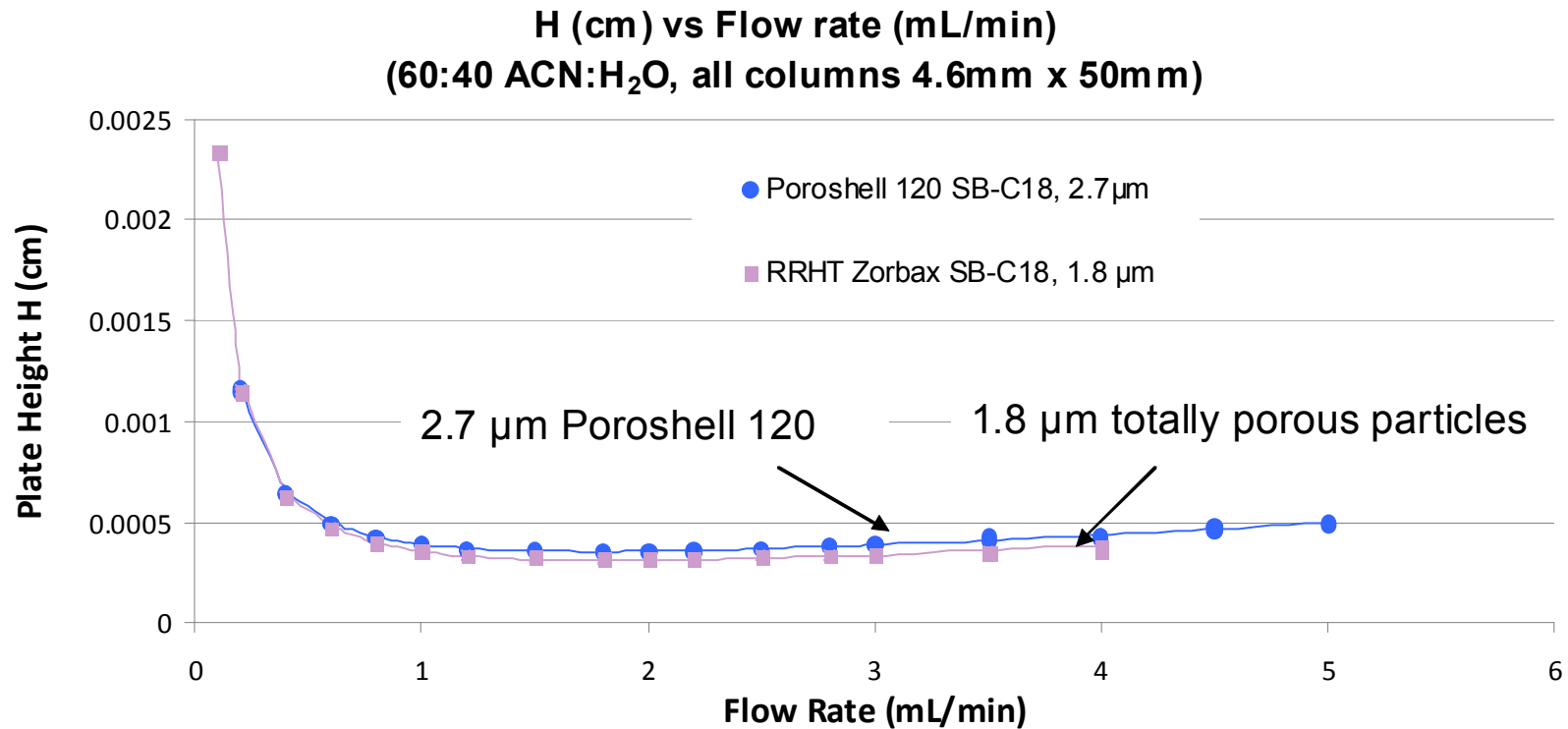
Hochauflösende Analysen in “kurzer” Zeit

Auswahl verschiedener Säulenlängen für die optimal Auflösung

Maximierung der Peakkapazität für Gradiententrennungen komplexer Proben



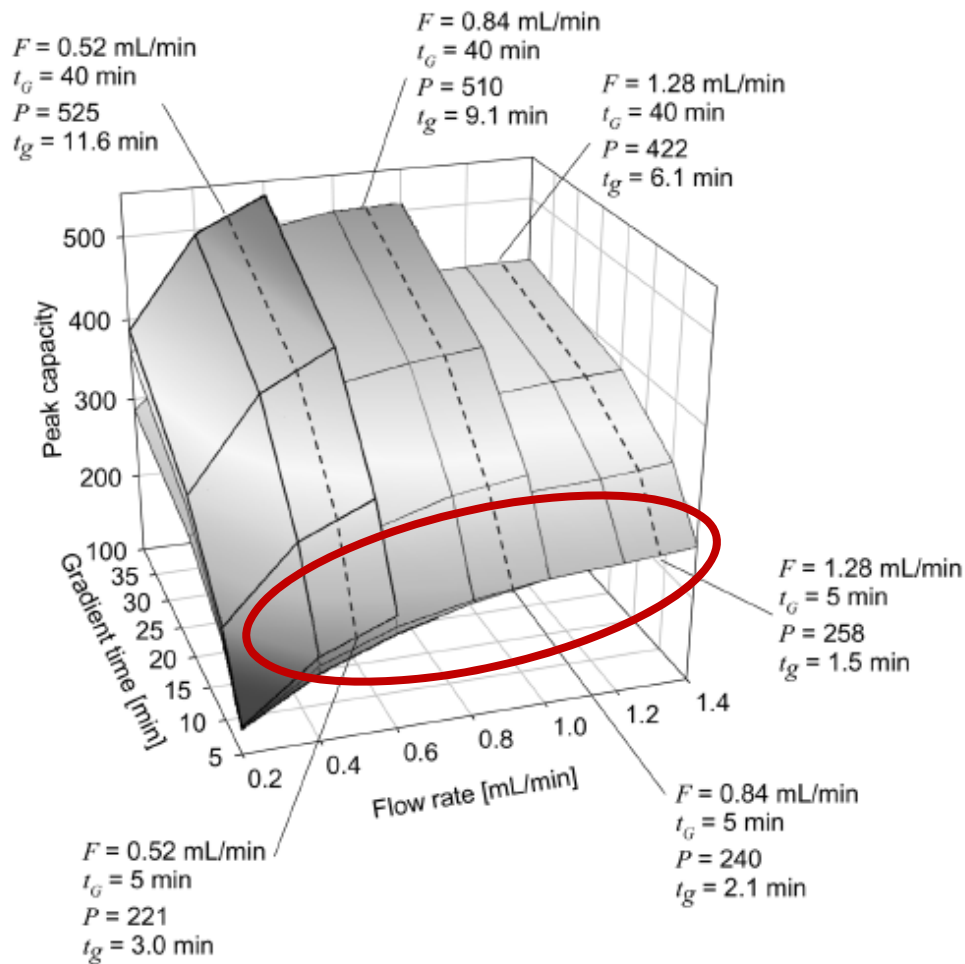
Van Deemter für Poroshell 120 und RRHT



Superficially porous Partikel und 1.8μm Partikel weisen sehr ähnliche Effizienzen auf und sind damit beide optimal einsetzbar für UHPLC.

Schnelle Analyse

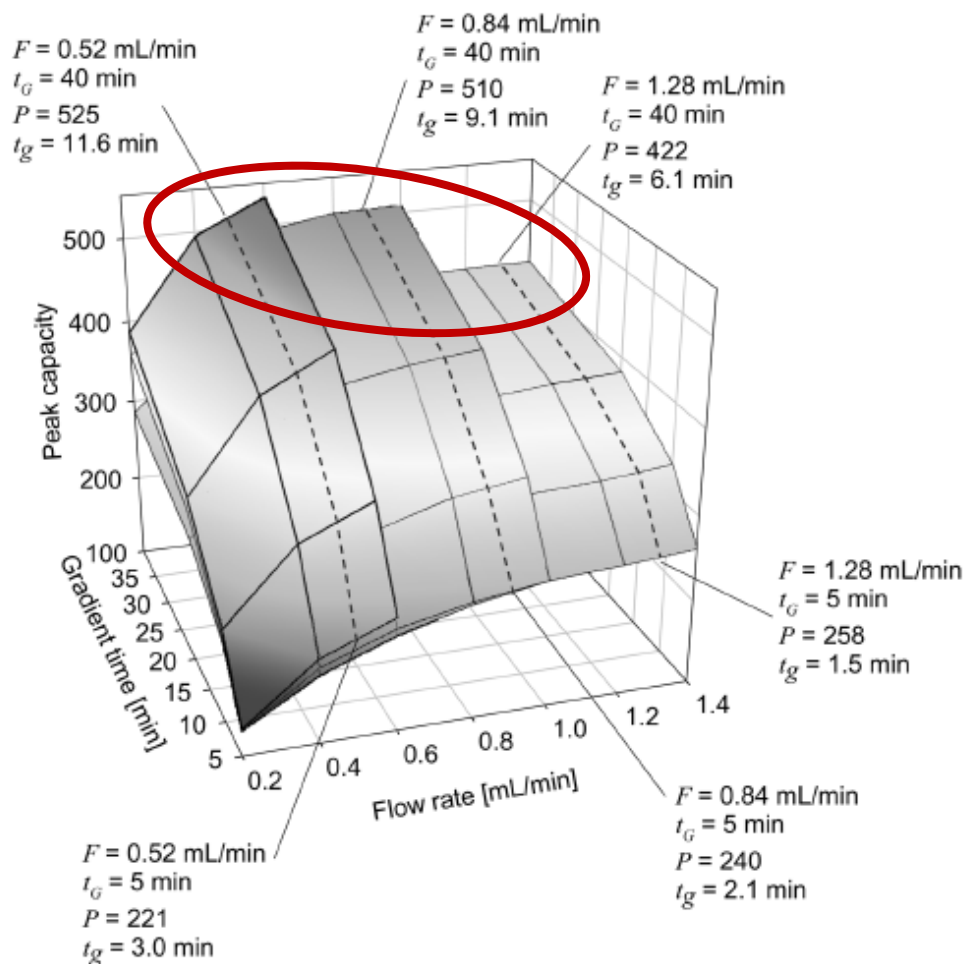
Höchste Peakkapazität in vorgegebener Zeit?



- Kurzer Gradient (5 min)
- Peakkapazitäten:
 - 258 für 50 mm
 - 240 für 100 mm
 - 221 für 150 mm

Schnelle Analyse

Höchste Peakkapazität in vorgegebener Zeit?



- Langer Gradient (40 min)
- Peakkapazitäten:
 - 422 für 50 mm
 - 510 für 100 mm
 - 525 für 150 mm

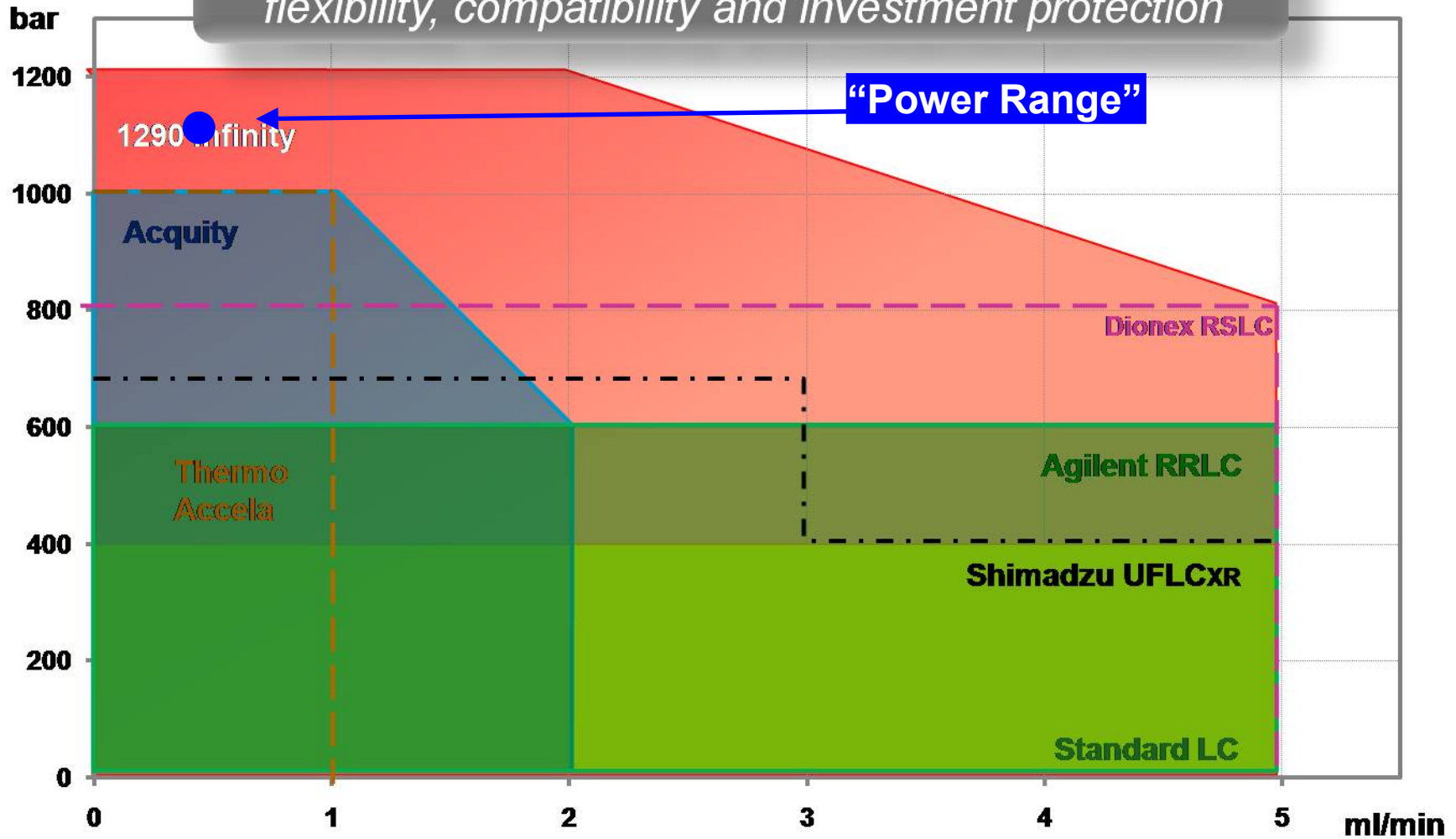
Maximale Leistung bei gegebener Gradientenzeit

Daumenregel: Einsatz höchster Flussrate und Temperatur

- $t_g < 5\text{min}$: 50 mm column length
- $5\text{min} < t_g < 30\text{min}$: 100 mm column length
- $t_g > 30\text{min}$: 150mm column length

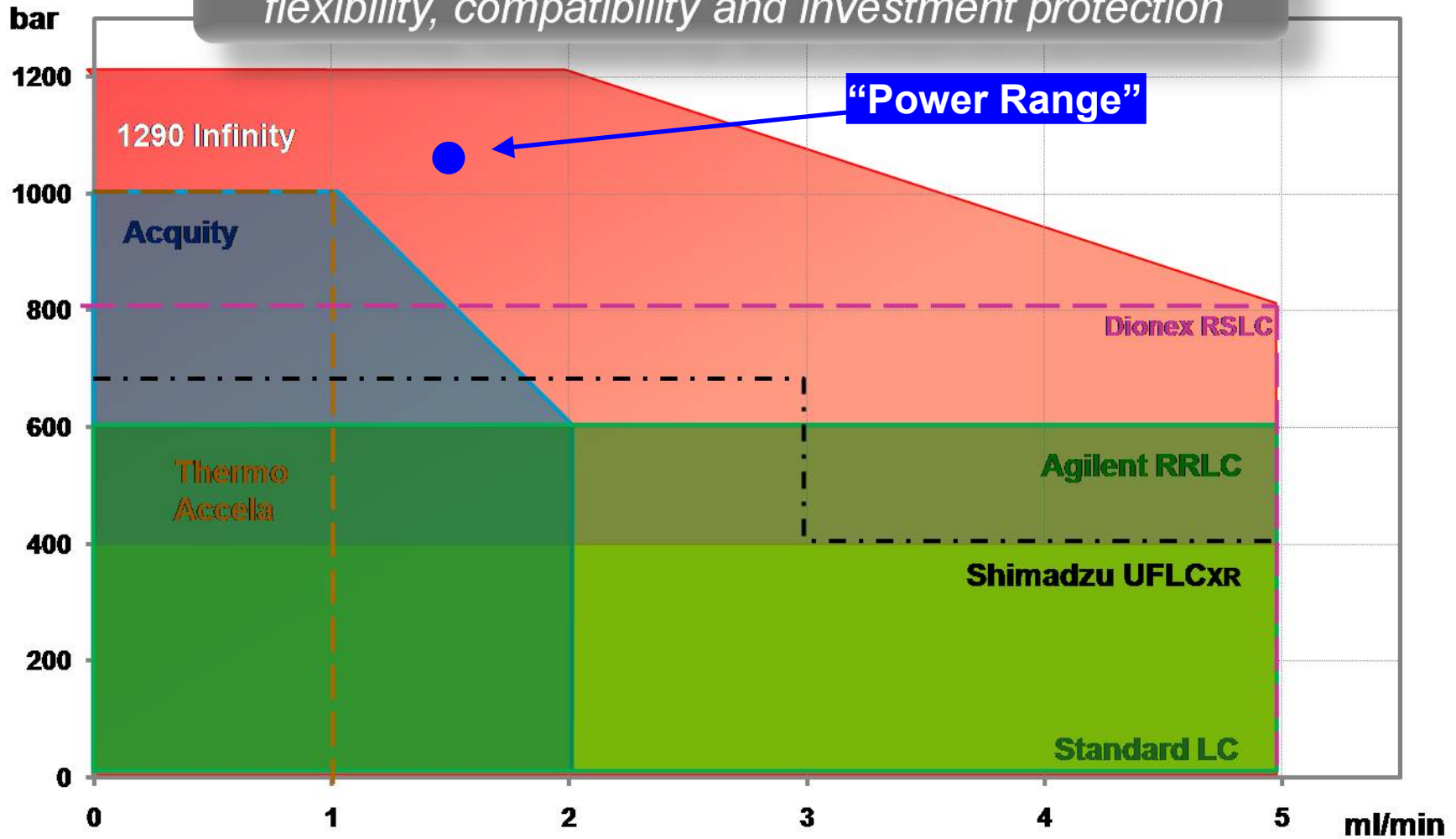
Einordnung des Beispiels im 1290 Infinity Bereich

A new power range providing maximum performance, flexibility, compatibility and investment protection



Einordnung des Beispiels im 1290 Infinity Bereich

A new power range providing maximum performance, flexibility, compatibility and investment protection



Breiter Selektivitäts- und Applikationsbereich für RRHD ZORBAX und Poroshell 120 Säulen

Startpunkt: Eclipse Plus C18, EndCapped C18/C8 und StableBond C18/C8

Unterschiedliche Selektivität

- Eclipse Plus C18, EndCapped C18/C8 und StableBond C18/C8

Optimale Peakform im gesamten pH-Bereich: 2-9

- Intensives Endcapping von C18-Phasen: Eclipse Plus C18 und EC C18/C8

Optimale Stabilität im sauren pH-Bereich

- C18-Phasen ohne chemisches Endcapping – StableBond C18

Weitere Phasen werden in Kürze im RRHD Format und als Poroshell 120 angeboten

Maximale Leistung bei gegebener Gradientenzeit

Daumenregel: Einsatz höchster Flussrate und Temperatur

- $t_g < 5\text{min}$: 50 mm column length
- $5\text{min} < t_g < 30\text{min}$: 100 mm column length
- $t_g > 30\text{min}$: 150mm column length

2346 J. Sep. Sci. 2008, 31, 2346–2357

Original Paper
Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography

Patrik Petersson*
André Franck*
James Heston*
Melvin R. Eady*

**Amersham Biosciences, Umeå, Sweden; *Amersham, R&D-Chromatid, Longborough, Oxfordshire, England, UK*

The practical effect of gradient time and flow rate on the peak capacity of a range of analytes of differing molecular weights (MW) and physicochemical properties have been evaluated using ultra high pressure LC instrumentation with sub-2 µm and supercritical porous particle phases. Optimum peak capacity, as for gradient LC, for small molecules, including typical pharmaceutical drugs, and peptides with MWs up to 1300, was demonstrated at a maximum flow rate for a given gradient time (i.e. up to 40 min). Flow rates significantly higher than the optimum in the same direction yield and also higher than those typically employed by the majority of the chromatography field are recommended for gradient LC, up to 1.6 mL/min on 50 × 150 × 3.3 µm 1.7 µm columns. This recommendation is applicable for temperatures above 40°C, or temperatures typically utilized for separations employing sub-2 µm particles to reduce column back pressure. This Director and peers via Director globe were determined and compared with theoretical gradient theory to explain our unexpected observations. The derived models exhibited good agreement between experimental and predicted peak capacities (absolute relative error 4%, peak error 2.4%).

Keywords: flow rate; gradient time; sub-2 µm particles; supercritical porous particles; temperature; HPLC

Received February 9, 2008; revised April 1, 2008; accepted April 27, 2008
 DOI: 10.1002/jssc.200801006

1 Introduction

The modern chromatographer is faced with the demands of analyzing a greater number of samples in increased productivity while maintaining or improving the quality of the data generated for analysis. To help the chromatographer achieve these objectives, smaller particle size stationary phases exhibit greater inherent efficiency and reduced analysis times and higher pressure LC systems are increasingly referred to as ultra high pressure LC or ultra performance LC. UPLC have been developed. Improved resolution and peak capacity for the analysis of many types of analytes such as peptides and proteins [1], nucleotides [2] and drug substance impurities [3–5] have now been demonstrated using submicron materials and UPLC systems.

As a consequence of the increased column materials available at high flow rates and long gradient times, the anticipated contribution to peak capacity however, in contrast to expectations application to peak capacity was not experimentally observed (Fig. 1). This was the case for analysis employing the Amersham Biosciences

Figure 1. Peak capacity versus flow rate determined for the separation of 1000 analytes with 1.7 and 3.0 µm porous particles at an inlet of 2.2 µm supercritical CO₂ gradient. Conditions: 40°C, 200 bar, 10–100% MeCN at a gradient time of 5 min, 254 nm. For further details see Section 2.

Correspondence: Dr. Patrik Petersson, Amersham Biosciences, Umeå, Sweden.
 E-mail: patrik.petersson@amersham.com
 Amersham Biosciences, SE-901 82 Umeå, Sweden
 © 2008 Wiley Periodicals, Inc. www.interscience.wiley.com

Check for updates at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

Some solutions to obtain very efficient separations in isocratic and gradient modes using small particles size and ultra-high pressure

Davy Guillaume, Dia Grata, Gaetan Glauser, Jean-Luc Wolfreider, Jean-Luc Veuthey, Serge Rudaz*

**School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Western Switzerland, CH-1205 Geneva 4, Switzerland*

ARTICLE INFO

Received 1 October 2008
 Received in revised form 3 February 2009
 Accepted 6 February 2009
 Available online 1 February 2009

Keywords: HPLC; temperature; gradient; ultra high pressure

ABSTRACT

The HPLC strategy which combines sub-2 µm porous particles and ultra high pressure (UHP) was investigated considering very high resolution columns in both isocratic and gradient modes, with mobile phase temperatures between 20 and 70°C. In isocratic mode, experimental conditions to reach the maximum efficiency were determined using the platelet plate representation for 2.2 µm × 100 mm. It has been demonstrated that the molecular weight of the compounds (MW) was a critical parameter which should be considered in the construction of such columns. With a MW around 3000 g/mol, 1.6 µm columns are high as 100000 plates could be theoretically obtained using HPLC at 40°C. By testing the columns length to 450 mm, the maximal plate number was around 30000 in gradient mode, the longer columns did not provide the maximal plate capacity for gradient mode in UPLC. This was attributed to the fact that small particles do not only refer to the plate number but also to column dead time. Therefore, a recommendation should be made and a 150 mm column should be preferred to obtain the highest plate number to 60 min at 40°C while the column length is around 2–3.000 mm (relative to only for 2.2 µm × 250 mm). Compared to 40°C, peak capacities were increased by about 20–30% for a constant gradient length at 50°C and gradient time decreased by 2.5-fold for an identical plate number. © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the historical structure of monolithic supports (i.e., macropores and micropores) the material porosity was well and similarly to a conventional column packed with 3–12 µm particles at a very low backpressure (high column permeability) equivalent to that of a column packed with 1 µm particles [1]. An commercial silica-based monoliths are available from Munktell® or Thermoquest® with a porous length of 100 cm, that have demonstrated that the small coupling of micropores column can be achieved to gain additional plate counts. For example, an monolithic column (150 length) grafted in series were used to achieve an efficiency of around 250,000 plates at a flow rate of 1 mL/min [2]. This set-up was also used for the complex separation of protein tryptic digests in gradient mode, and peak capacity of 1200 were obtained at 200 min [3]. In order to avoid the loss of efficiency due to the construction of monoliths, it is of utmost interest to work under conditions that maximize the plate number. Over the last decade, several approaches based on the use of monolithic supports, high temperature liquid chromatography (HTLC), and columns packed with sub-2 µm particles in ultra-high pressure conditions (UHPLC) were developed to improve efficiency and resolution in liquid chromatography (LC) [4–7].

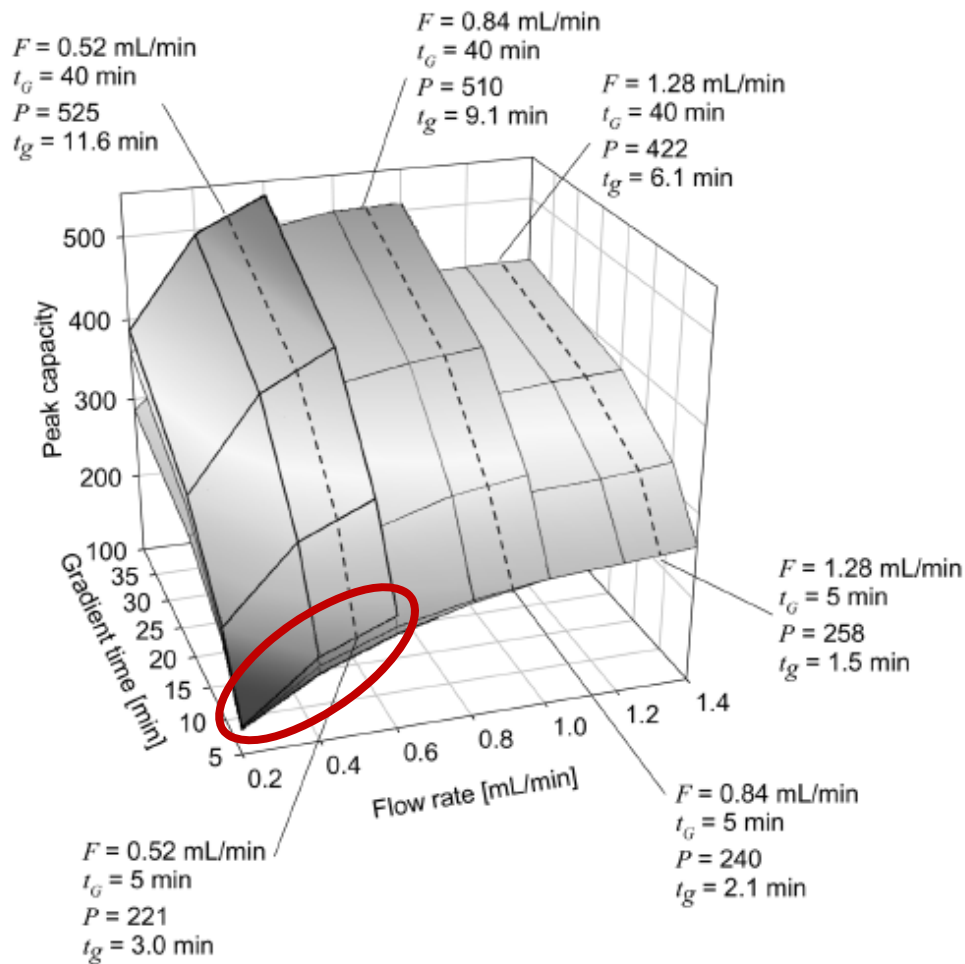
* Corresponding author. Tel.: +41 22 379 40 77; fax: +41 22 379 40 66.
 E-mail address: serge.rudaz@unige.ch (S. Rudaz).
 0021-9693/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
 DOI:10.1016/j.chroma.2008.10.012

P. Petersson et al (AZ), J. Sep. Sci, 31, 2346-2357, 2008

D. Guillaume et al, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 3232–3243, 2009

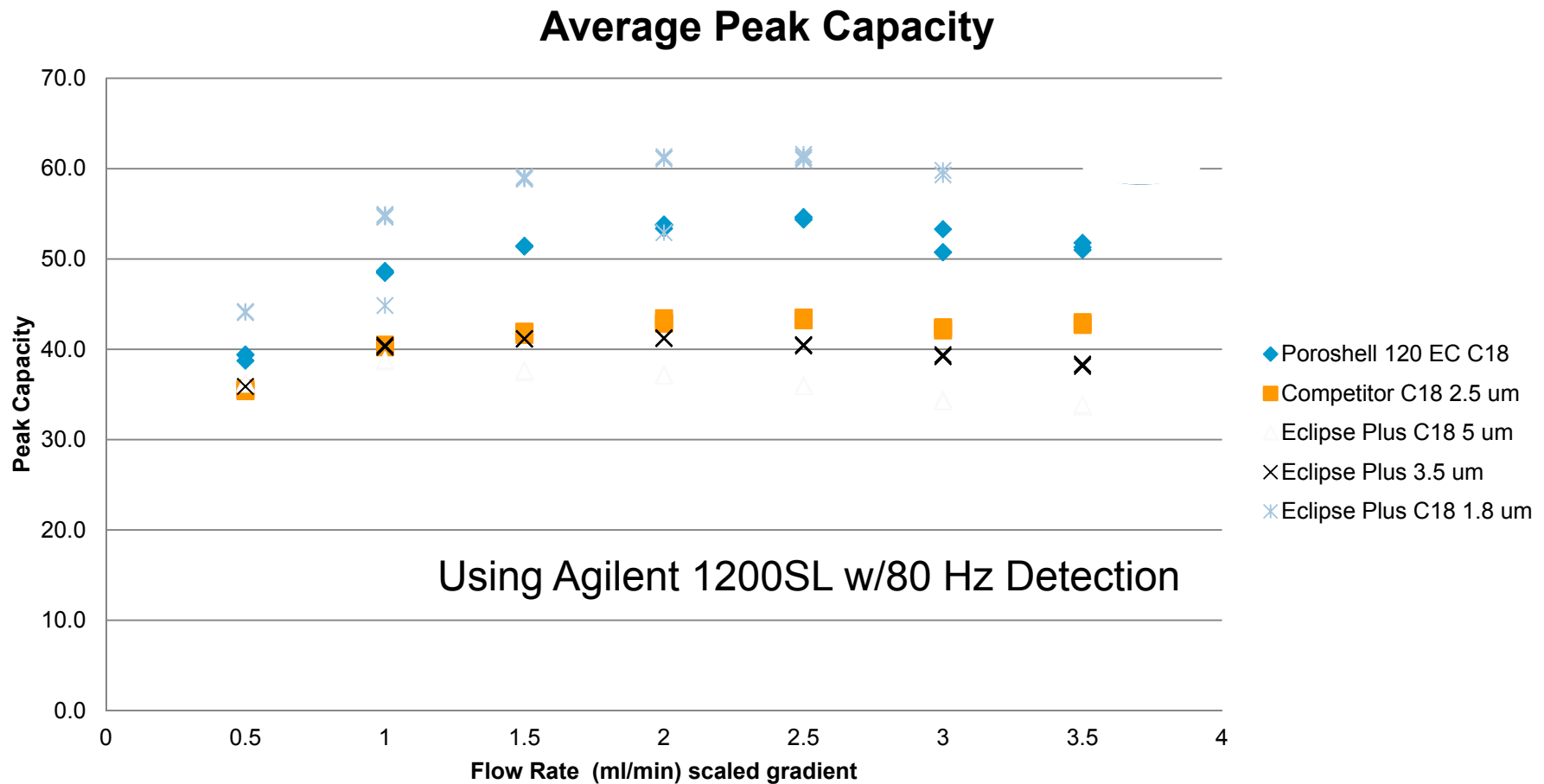
Schnelle Analyse

Höchste Peakkapazität in vorgegebener Zeit?



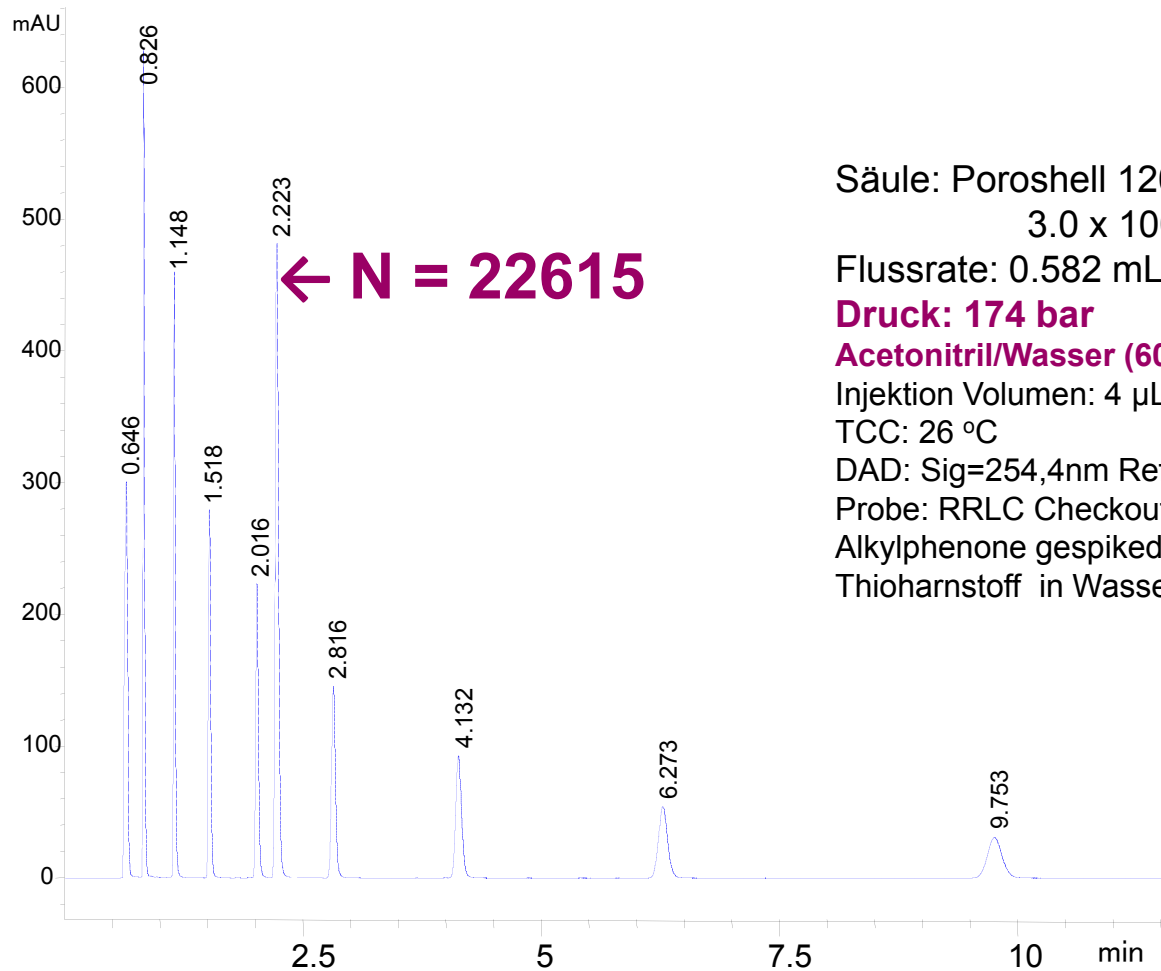
- **Je höher die Flussrate umso höher die Peakkapazität!**
- Dies gilt für alle Säulen- und Gradientenlängen!

Effizienz von Poroshell 120 ist minimal geringer als die von RRHT, aber bei kleinerem Druck



Poroshell 120

hohe Trenneffizienz bei geringem Druck



Säule: Poroshell 120 EC-C18,
3.0 x 100mm, 2.7 μ m
Flussrate: 0.582 mL/min
Druck: 174 bar
Acetonitril/Wasser (60:40)
Injektion Volumen: 4 μ L
TCC: 26 °C
DAD: Sig=254,4nm Ref=360,100nm
Probe: RRLC Checkout Probe (PN 5188-6529),
Alkylphenone gespiked mit 50 μ L 2 mg/mL
Thioharnstoff in Wasser/Acetonitril (65:35)

Hohe Auflösung: 12 Phenole auf langer Poroshell 120 EC-C18 Säule – unter 400 bar!

Säule: Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 100mm, 2.7µm

Mobile Phase:

Solvent A: Wasser with 0.1% Ameisensäure

Solvent B: Acetonitril

Gradient::

Zeit	%B
2.0	5%
17	60%

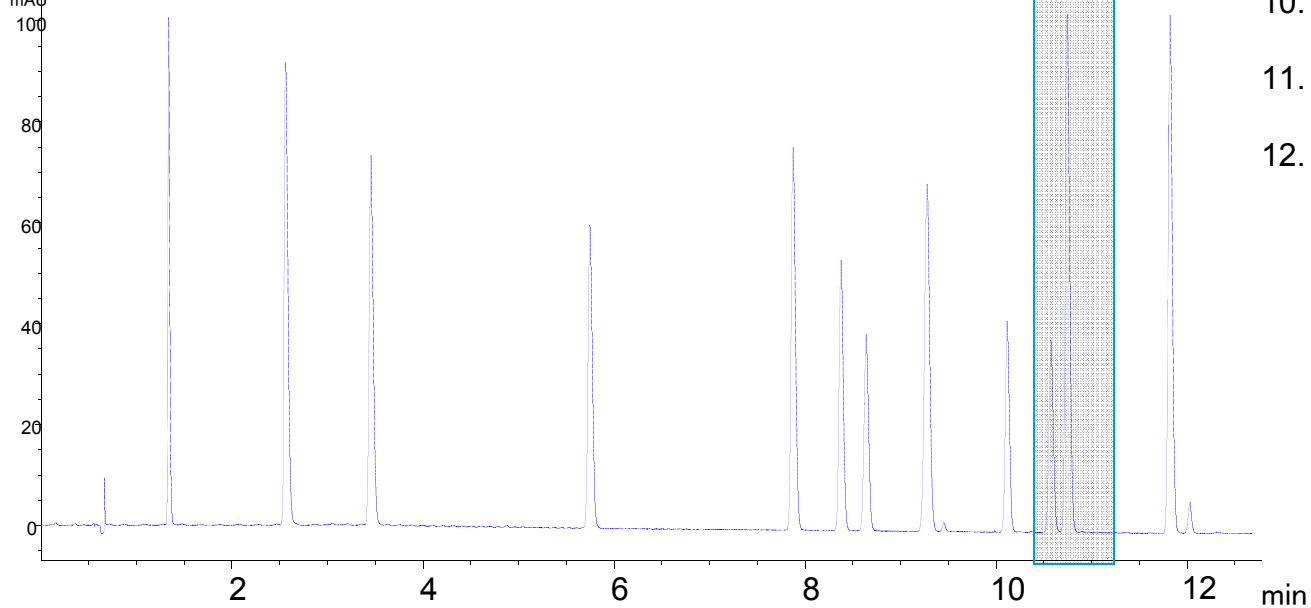
1200 SL

Temp.: 25 °C

2 mm Flusszelle

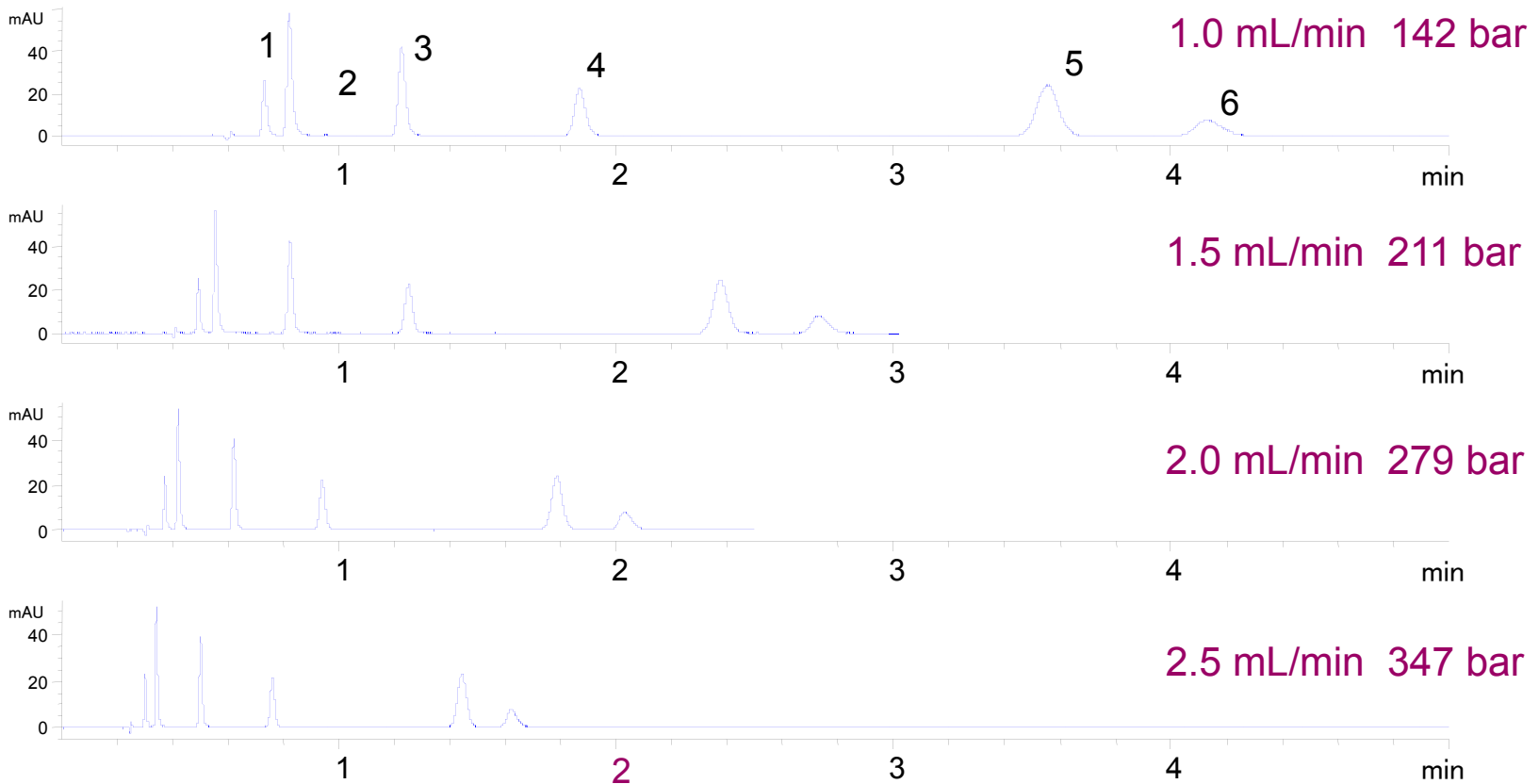
2.0 ml/min, 394 bar

1. Hydroquinon
2. Resorcinol
3. Catechol
4. Phenol
5. 4-Nitrophenol
6. p-cresol
7. o-cresol
8. 2-Nitrophenol
9. 3,4 di methyl phenol
10. 2,3 di methyl phenol
11. 2,5 di methyl phenol
12. 1-naphthol



Schnelle Analyse von Pharmazeutika auf Poroshell 120 – Hohe Flussraten

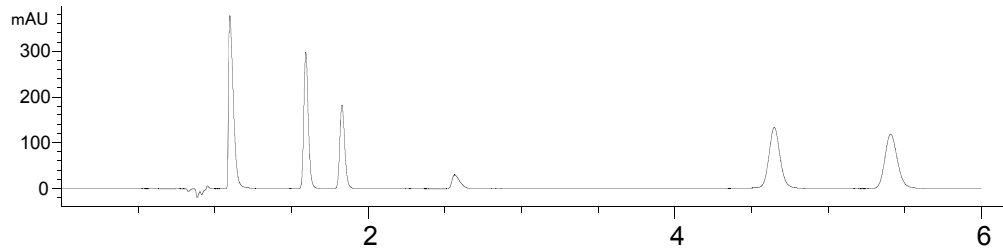
1. Acetaminophen 2. Caffeine 3. 2-acetamidophenol 4. Acetanilide 5. Phenacetin 6. Salicylic acid



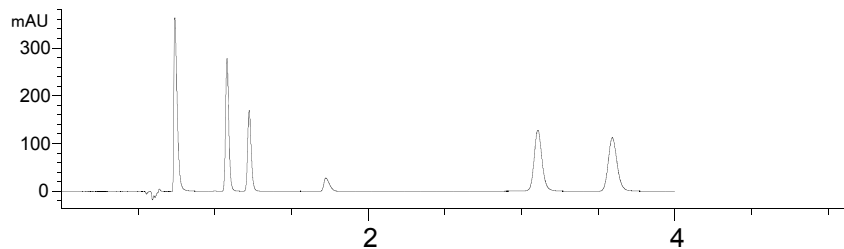
LC: 1200SL; Säule: Poroshell 120 SB-C18, 4.6 x 50mm, 2.7µm Mobile Phase: 0.2% Ameisensäure 80% Wasser:20%
CAN; Temperatur: 25 °C, Detektion: 275 nm, Injekt.vol: 2µl

Poroshell 120 EC-C18 - schnelle *UHPLC* Analysen

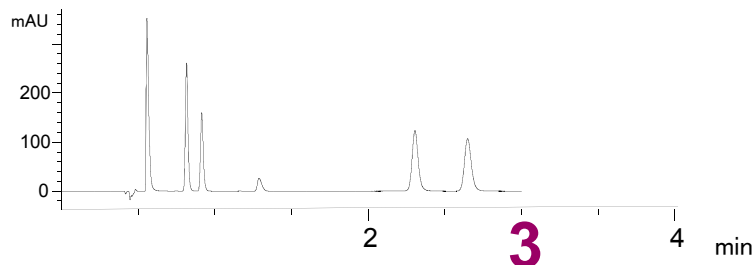
Viskose Lösungsmittel wie Methanol können problemlos eingesetzt werden.



Flussrate = 0.75 mL/min,
P = 433 bar



Flussrate = 1.0 mL/min,
P = 559 bar



Säule: Poroshell 120 EC-C18 3.0 x 100mm, 2.7µm Mobile Phase: 65% A: 0.2% Ameisensäure: 35% B: Methanol
Isokratisch, Flussrate variiert 1 µL Injektion 26 °C Sig = 220, 4 nm, Ref = Off Probe: 1. Saccharin
2. Coffein 3. P-hydroxybenzoesäure 4. Aspartam 5. Dehydroeisigsäure 6. Benzoesäure