

1

Wann sollte ich meine UHPLC als UHPLC betreiben?*S. Kromidas*

Moderne analytische LC-Anlagen sind ausnahmslos als UHPLC-Anlagen konzipiert. Allerdings werden außerhalb von reinen Forschungslabors höchstens ca. 30–40 % der Trennungen an UHPLC-Anlagen unter UHPLC-Bedingungen durchgeführt. Damit sind Drücke oberhalb ca. 800 bar gemeint. In welchen Fällen ist es nun sinnvoll oder sogar notwendig, die vorhandene UHPLC-Anlage tatsächlich unter UHPLC-Bedingungen zu betreiben? Und in welchen Fällen sollte man dagegen die UHPLC-Anlage möglicherweise eher im „klassischen“ HPLC-Modus oder lediglich für schnelle HPLC-Trennungen einsetzen? Und: Sollte die nächste LC-Anlage vielleicht doch wieder eine HPLC werden? Genau um solche Entscheidungen geht es in diesem Kapitel. Dazu hilft die Beantwortung zweier Fragen, mit denen wir uns beschäftigen werden. Die erste lautet: „Was benötige ich eigentlich?“ Dabei gilt es zu definieren, welche Charakteristika einer HPLC-Methode in genau *dieser* Situation im Vordergrund stehen, z. B.: kurze Retentionszeiten, zuverlässige Methode, maximale Auflösung/Peakkapazität, niedrige Nachweisgrenze u. Ä. Die zweite Frage ist wesentlich einfacher: „Was vermag die UHPLC mehr als die HPLC?“ Anschließend werden wir die Kernfrage diskutieren: „Wie bringe ich meine Anforderungen an die Methode unter Berücksichtigung der realen Laborsituation mit dem Potenzial der UHPLC sinnvoll zusammen?“ *Bemerkung:* Theoretische Hintergründe werden vorausgesetzt, die Prinzipien der HPLC-Optimierung lediglich genannt, jedoch nicht hergeleitet. Hier wird auf die entsprechende Literatur verwiesen (z. B. [1–5]).

1.1

Was möchte ich erreichen und was „kann“ die UHPLC?**Was möchte ich erreichen?**

Für eine HPLC-Methode wünscht man sich oft mehr als nur ein Attribut, z. B.: „gute“ und „schnelle“ Trennung. Es sind jedoch vor der Entscheidung für das Methodendesign – die ja auch die Frage nach der Notwendigkeit von UHPLC-Bedingungen beinhaltet – dringend zwei Punkte zu klären. *Erstens:* Welche sind die Eigenarten der Methode, ferner wie ist das Umfeld? Es geht demnach u. a.

um folgende entscheidenden Merkmale: mögliche Belastung der Probe mit Matrix, notwendige Zeit für die Probenvorbereitung oder die manuelle Integration, Erfahrung der Anwender, wechselnde oder gleichbleibende chromatographische Bedingungen, Forschungs- oder Routinelabor etc.? *Zweitens*: Was ist im konkreten Fall die primäre Anforderung an *diese* Methode? Das Hauptziel sollte klar identifiziert, ein zweites ggf. ein drittes lediglich als Wunsch angesehen werden, z. B.: „In diesem Fall brauchen wir aus diesem Grund unbedingt maximal mögliche Empfindlichkeit – wenn die Methode dabei auch robust ist, wäre es schön ...“ Nachfolgend sind vier typische Anforderungen an eine HPLC-Methode aufgeführt, die wir anschließend genauer betrachten werden:

- Gut trennen; das kann zum einen ausreichende Auflösung bedeuten – d. h. Trennung zwischen zwei Peaks, evtl. Trennung von 2–3 relevanten/kritischen Peakpaaren. Oder zum anderen ausreichende Peakkapazität, d. h. Trennung von vielen – allen(?) – evtl. chemisch ähnlichen Komponenten, also möglichst viele Peaks pro Zeiteinheit, s. Abschnitt 1.2.1
- Schnell trennen; kurze Retentionszeiten, damit geht häufig auch ein geringer Lösemittelverbrauch einher, s. Abschnitt 1.2.2
- Empfindlich messen; Abnahme der Nachweisgrenze, d. h. Verbesserung der relativen Massensensitivität, s. Abschnitt 1.2.3
- Robuste Bedingungen; zuverlässige Methoden, welche zu einer Vermeidung von Wiederholmessungen und zur Minimierung von Geräteausfallzeiten führen, s. Abschnitt 1.2.4.

Was „kann“ die UHPLC?

Vereinfacht gesagt ist eine UHPLC-Anlage ein Gerät, welches erstens im Vergleich zu einem HPLC-Gerät ein ca. 10-mal geringeres Totvolumen (Dispersionsvolumen, „Extra Column Volume“: Volumen vom Autosampler bis zum Detektor ohne Säule) bzw. Verweilvolumen (Verzögerungsvolumen, „Dwell oder „Delay Volume“: Volumen von Mischventil/Mischkammer bis zum Säulenkopf) aufweist. Das Totvolumen einer modernen UHPLC-Anlage beträgt heute $\leq$ ca. 7–10 μL – mithilfe spezieller Kits sogar $\leq$ ca. 4 μL –, die Verweilvolumina betragen ca. 100–200 μL bei Niederdruck- (NDG) und ca. 35–50 μL bei Hochdruckgradienten (HDG).

Bemerkung: Statt von „Extra Column Volume“ ist immer häufiger die Rede von „Extra Column Dispersion“. Damit wird dem Umstand Rechnung getragen, dass die Geometrie z. B. von Verbindungen/Mischventilen und somit das Strömungsprofil für die Peakverbreiterung wichtiger als das absolute Totvolumen ist, s. dazu detaillierte Ausführungen in Abschnitt 2.1 und Kapitel 3.

Zweitens erlaubt eine moderne UHPLC-Anlage Arbeitsdrücke bis ca. 1500 bar.

1.2

Anforderungen an eine HPLC-Methode

1.2.1

Gut trennen

Zunächst soll in Kürze dargelegt werden, wie die Trennung in der HPLC prinzipiell verbessert werden kann, anschließend werden wir schauen, welchen Beitrag die UHPLC hinsichtlich einer besseren Trennung leisten kann.

In der HPLC unterscheiden wir bezüglich der Güte einer Trennung zwei Fälle:

1. Mich interessieren im Wesentlichen nur eine oder einige Komponenten. Es geht somit um die nach meinen individuellen Kriterien ausreichende Trennung zwischen der besagten Komponente und einer „Störkomponente“ – also letzten Endes um die Trennung zweier Peaks. Im Fokus kann das kritische Paar sein (z. B. Haupt-/Nebenkomponente), möglicherweise auch 2–3 weitere Peakpaare. Das Kriterium hier ist die Auflösung, sie stellt vereinfacht den Abstand zwischen den Peaks an der Basislinie dar.

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \quad (1.1)$$

Mit: R : Auflösung, N : Bodenzahl, grundsätzlich für isokratische Bedingungen definiert, α : Trennfaktor (früher: Selektivitätsfaktor), k : Retentionsfaktor (früher: Kapazitätsfaktor, k').

2. Ich will/muss „alle“ vorhandenen Peaks genügend gut trennen, d. h. möglichst basisliniengetrennt. In diesem Fall kommt die Peakkapazität ins Spiel: Dies ist die Gesamtanzahl der Peaks, die ich mit einer genügend guten Auflösung (z. B. $R = 1$) in einer bestimmten Zeit trennen kann. Oft wird als Maß für die Peakkapazität die Summe aller Auflösungen angegeben. In der Literatur finden sich mehrere Formeln für die Peakkapazität, betrachten wir hier die zwei einfachsten:

$$n_c = \frac{t_{Rl} - t_{Re}}{w} \quad \text{oder} \quad (1.2a)$$

$$n_c = \frac{t_G}{w} \quad (1.2b)$$

Mit: n_c : Peakkapazität, t_{Rl} : Retentionszeit des letzten Peaks, t_{Re} : Retentionszeit des ersten Peaks, t_G : Gradientendauer, w : Peakbreite an der Peakbasis.

Bemerkung: Circa 70–80 % der Trennungen sind heute Gradiententrennungen; somit ist die HPLC/UHPLC-Anlage von heute ein Hochdruck- oder ein Niederdruckgradient mit DAD und/oder MS/MS, ferner werden immer häufiger Aerosoldetektoren verwendet. Die hier vorgestellten Überlegungen gelten prinzipiell sowohl für isokratische als auch für Gradiententrennungen, dennoch werde ich aus eben dargelegtem Grund den Fokus etwas mehr auf Gradiententrennungen legen.

Betrachten wir zunächst die Auflösung:

Gleichung 1.1 kann man entnehmen, dass die Auflösung durch Zunahme des Effizienz-, Retentions- und des Selektivitätsterms verbessert werden kann. Bezüglich des Retentionsterms lautet die Forderung: stärkere Wechselwirkungen, wobei der optimale Wert bei ca. $k \approx 3-5$ liegt, d. h. die interessierenden Peaks sollten bei/nach ca. der 3 bis 5-fachen Tot- oder Mobilzeit eluieren. Aus Gl. (1.1) ist ersichtlich, dass der Selektivitätsterm und damit der Trennfaktor α mit Abstand die empfindlichste Funktion für die Auflösung darstellt: $(\alpha - 1)/\alpha$! Die Bodenzahl dagegen steht unter der Wurzel, eine Verdoppelung von N führte zu einer Verbesserung der Auflösung „nur“ um Faktor ca. 1,4. Zwei Zahlenbeispiele sollen dies veranschaulichen, für eine detaillierte Diskussion, s. [6]:

1. Gesetzt den Fall, zwei Peaks eluieren mit einem α -Wert von 1,01. Um diese zwei Peaks basisliniengetreunt zu trennen, benötigte man ca. 160 000 Böden. Gelingt es den α -Wert von 1,01 auf 1,10 zu erhöhen, benötigte man für die gleiche Auflösung lediglich knapp 2000 Böden. Auch eine gering anmutende Verbesserung des α -Wertes von 1,01 auf 1,05 führte dazu, dass man statt 160 000 Böden nun ca. 6000 Böden benötigte.
2. Gesetzt ferner den Fall, es liegt eine Trennung mit folgenden Werten vor: $k = 2$, $\alpha = 1,05$ und $N = 9000$. Es ergibt sich eine Auflösung von $R = 0,75$. Das ist ungenügend, die Auflösung sollte auf $R \geq 1,00$ verbessert werden (bei $R = 1$, Überlappung der beiden Peaks von ca. 5 %). Zunächst kann die Wechselwirkung erhöht werden, z. B. durch eine hydrophobere stationäre Phase oder eine wasserreichere mobile Phase. Gehen wir davon aus, dass die stärkeren Wechselwirkungen sich auf beide Komponenten gleich auswirken, so bleibt die Selektivität konstant. Der k -Wert erhöhte sich von $k = 2$ auf beispielsweise $k = 6$, die Auflösung verbesserte sich in diesem Fall auf $R = 0,97$. Alternativ könnte man eine Säule mit 15 000 Böden verwenden, die Auflösung verbesserte sich ebenso auf $R = 0,97$. Beide Maßnahmen – stärkere Wechselwirkungen oder höhere Bodenzahl – sind somit zwar richtige, jedoch keine besonders effektiven Maßnahmen, wenn es darum geht, die Auflösung merklich zu verbessern. Wäre man dagegen in der Lage, den α -Wert von 1,05 auf beispielsweise 1,10 zu erhöhen, ergäbe sich eine Auflösung von $R = 1,44$. Beenden wir das zweite Beispiel mit folgender Betrachtung: Wenn zwei Peaks unterschiedlich groß sind (z. B. Wirkstoff-Verunreinigung) und/oder tailen, müsste die Auflösung ca. $R \geq 2$ betragen, wenn der Integrationsfehler unterhalb von ca. 1 % bleiben soll [7]. Im vorliegenden Fall stehen zwei Alternativen zur Verfügung, um die Auflösung auf $R = 2$ zu verbessern: Den α -Wert von 1,10 lediglich auf 1,15 zu erhöhen oder die Bodenzahl – bei konstant gehaltenem α -Wert von 1,10 – von 9000 auf 18 000 Böden zu verdoppeln. Letzteres wäre beispielsweise mit einer 150 mm, 2,5 μm -Säule möglich.

Als Faustregeln könnte man sich für eine Basislinientrennung wie folgt merken:

- Wenn in einer realen Probe der α -Wert des kritischen Paares etwa 1,05 beträgt, wären für eine Basislinientrennung ca. 20 000 Böden notwendig.

- Beträgt der α -Wert ca. 1,02, benötigte man ca. 100 000 Böden.
- Bei einem α -Wert von 1,01 wird man wohl ohne 2D-Chromatographie kaum zum Erfolg kommen können (s. Kapitel 6).

Diese Zahlenbeispiele gelten sowohl für isokratische als auch für Gradiententrennungen.

Bemerkung

Die Bodenzahl ist für isokratische Trennungen definiert. Es gibt mehrere Formeln, die wohl einfachste lautet:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{16 \cdot t_R^2}{w^2} \quad (1.3)$$

mit: N : Bodenzahl, L : Länge der Säule, H : Bodenhöhe, t_R : Retentionszeit, w : Peakbreite an der Peakbasis.

Wenden wir uns zunächst der Frage zu, „Welche Bedeutung hat die Bodenzahl bei isokratischen und bei Gradiententrennungen?“ Wenn ein Peak bei isokratischen Läufen später eluiert, wird er breiter, der Quotient t_R/w bleibt jedoch konstant, somit auch die Bodenzahl. Halten wir fest: Für eine Komponente im isokratischen Modus ist die Bodenzahl – zumindest theoretisch – eine Konstante. Das heißt sie ist unabhängig von der Retentionszeit, wenn diese sich durch eine Änderung der stationären, der mobilen Phase oder der Temperatur – aber nicht durch den Fluss! – ändert. Denn noch einmal: Die Peaks eluieren später/früher und sie werden dadurch breiter/schmäler – der Quotient Retentionszeit/Peakbreite bleibt konstant und damit auch die Bodenzahl. Hierbei wird unterstellt, dass der Mechanismus bei der Wechselwirkung mit der stationären Phase konstant bleibt. Wie sind nun die Verhältnisse im Gradientenmodus? In der Literatur wird vielfach darauf hingewiesen, dass die Bodenzahl nur für isokratische Trennungen bestimmt werden kann. So wird im Zusammenhang mit dem Gradienten statt Bodenzahl häufig der Terminus „Trennschärfe“ verwendet. Dennoch gibt es prinzipiell keinen Grund nicht auch beim Gradienten von einer „Bodenzahl“ N_{Gr} zu sprechen – geringstenfalls als Gedankenexperiment. Betrachten wir einen Peak, der bei einer Gradientenmethode nach der gleichen Retentionszeit eluiert wie bei einer isokratischen Methode. Gleichung 1.3 zugrunde gelegt, ergibt sich eine größere „Bodenzahl“ N_{Gr} , denn t_R bleibt gleich, aber w ist nun kleiner – und bleibt weitgehend auch konstant. Somit gilt für einen gegebenen Peak, der später eluiert, vereinfacht wie folgt. Isokrat: Der Quotient t_R/w bleibt konstant, die Bodenzahl bleibt ebenso konstant. Gradient: t_R nimmt zu, w bleibt konstant, die „Bodenzahl“ N_{Gr} nimmt zu. Was bedeutet dies für die Trennung?

Bei isokratischen Trennungen lässt sich das kritische Paar gezielt in den optimalen Retentionsbereich „schieben“ und durch die dann herrschende optimale Selektivität ergibt sich die maximale Auflösung – jedoch nur für *dieses* kritische Paar, andere Peakpaare werden eventuell nicht so gut getrennt. Bei einem Gradientenlauf ergibt sich zwar dadurch, dass die Peaks zusammenrücken, womöglich eine geringere Selektivität, aber wie wir gesehen haben eben eine höhere „Bodenzahl“ N_{Gr} , die Peaks sind schmal. Die Selektivität beeinflusst, wie weiter oben

dargelegt, die Auflösung wesentlich stärker als die Bodenzahl und dadurch haben wir für das kritische Paar unter isokratischen Bedingungen eine bessere Auflösung im Vergleich zu einem Gradientenlauf. Es sei denn, es ergibt sich in einem bestimmten Fall eine sehr langsame Kinetik bei der Desorption einer – oder mehrerer – Komponenten von der stationären Phase z. B. große Adsorptionseenthalpie (sehr starke Wechselwirkung), multipler Mechanismus, große Moleküle. In diesem Fall überwiegt der Vorteil der höheren Bodenzahl beim Gradienten und wir haben unter Gradientenbedingungen aufgrund von schmalen Peaks die bessere Auflösung. Beim Gradienten existieren darüber hinaus im Vergleich zu isokratischen Trennungen mehr Möglichkeiten, die Selektivität „vorne“ und „hinten“ im Chromatogramm zu verändern, man ist einfach flexibler. Die im Vergleich zu isokratischen Trennungen erhöhte „Bodenzahl“ N_{Gr} ist die Ursache für eine bessere mittlere Auflösung (oft als Summe der Auflösungen angegeben), was letzten Endes eine bessere Peakkapazität bedeutet, s. weiter unten im gleichen Abschnitt. Aus praktischer Sicht heißt dies, dass gerade für Gradiententrennungen die hohe Bodenzahl einer Säule – also eine „gute“ Packungsqualität – nicht die Wichtigkeit hat, wie es oft in Broschüren von Säulenherstellern suggeriert wird. Beispiel: „Unsere neue Säule XYZ weist 450 000 Böden/m auf“. Häufige chromatographische Bedingungen bei solchen Läufen lauten: Acetonitril/Wasser, kleiner Fluss, einfache, neutrale Aromaten, 1 μ L Injektionsvolumen. Die Angabe „450 000 Böden/m“ kann von Anwendern nun so verstanden werden, dass beim Einsatz jener Säule diese Bodenzahl (bei einer 100 mm-Säule ca. 40 000–45 000 Böden) tatsächlich zur Verfügung stünde.

Merke jedoch

Die Bodenzahl wird nicht nur von der Packungsqualität und der Teilchengröße beeinflusst. Weit mehr als 15 Faktoren spielen eine Rolle, z. B. Eluentenzusammensetzung und Temperatur (Viskosität), Totvolumen der Apparatur (genauer: Dispersion der Substanzbande), Korngrößenverteilung, Fluss, Injektionsvolumen und Probenkonzentration, Konstitution und pH-Wert der Probenlösung, chemische Struktur/Diffusionskoeffizient des Analyten – und nicht zuletzt beeinflussen die Einstellparameter das Aussehen der Peaks. So deuten beispielsweise breite, tailende Peaks auf eine langsame Kinetik (z. B. zusätzliche ionische Wechselwirkungen, große Moleküle) oder ein beträchtliches Totvolumen *dieser* Apparatur für *diese* Säule hin – trotz „guter“ Bodenzahl der Säule.

Halten wir abschließend fest: Die Erhöhung der Selektivität „bringt“ grundsätzlich das meiste, wenn es um eine Verbesserung der Auflösung geht, eine Erhöhung der Bodenzahl ist zweitrangig, Van-Deemter-Kurven werden durch das Marketing der Hersteller viel zu stark überbewertet.

Wie kann ich die Selektivität nun verbessern? Änderung des pH-Wertes, Zugabe von Modifier sowie die Verwendung anderer stationärer Phasen sind wichtige Faktoren und unabhängig von der Hardware. Kommen wir jetzt zur UHPLC, was kann sie hier konkret leisten? Von den zwei Vorteilen der UHPLC – kleines Tot-/Verweilvolumen und die Möglichkeit, bei höheren Drücken arbeiten zu kön-

nen – kann hier der zweitgenannte genutzt werden. In folgenden Fällen geht mit den Bemühungen um eine Verbesserung der Selektivität auch eine Erhöhung des Druckes einher, eine Situation, für die eine UHPLC-Anlage zweifelsohne konzipiert ist:

- Methanol als organisches Lösemittel; bei der Trennung polarer Moleküle ergibt sich häufig eine bessere Selektivität im Vergleich zu Acetonitril.
- Erniedrigung der Temperatur; bei der Trennung bestimmter Substanzen (Enantiomere, α - β -/Doppelbindungsisomere) zeigt sich bei niedrigen Temperaturen oft eine Verbesserung der Selektivität.
- Druck; bei Drücken ab ca. 600–700 bar kann sich die Polarisierbarkeit bestimmter Moleküle (z. B. Prednison/Prednisolon, Konformationsisomere, Tocopherole etc.) verändern. Die Selektivität verändert sich ebenso (Verbesserung?) und in Kombination mit bestimmten stationären Phasen wie C₃₀, „Mixed Mode Phases“ sowie weiteren „Shape Selectivity Phases“ ergeben sich interessante Möglichkeiten. Man baue dazu beispielsweise direkt nach der Säule einen Restriktor mit einem möglichst geringen Volumen ein. Die Robustheit ist allerdings bei kleinen Druckschwankungen in diesem Bereich kritisch zu sehen.
- Fluss; Erhöhung des Flusses führt zu einer Erhöhung des Gradientenvolumens (Gradientenvolumen: Gradientendauer $\times$ Fluss).

Man kann natürlich zwei Faktoren gleichzeitig verändern und die Möglichkeit der UHPLC, bei höheren Drücken arbeiten zu können, „optimal“ nutzen: z. B. bei Gradientenläufen die Temperatur auf 10 °C erniedrigen und zeitgleich den Fluss erhöhen. In einem Fall wurde dadurch die Anzahl der erschienenen Peaks gegenüber der ursprünglichen, validierten Methode um knapp 30 % erhöht.

Kommen wir jetzt zur Peakkapazität.

Es gibt Fälle, in denen eine Verbesserung der Selektivität kaum möglich ist, z. B.:

- Sehr viele, vielleicht sogar ähnliche Komponenten, evtl. noch dazu in einer komplexen Matrix.
- Herrschen hydrophobe Wechselwirkungen vor, sind diese nicht besonders spezifisch und es ergeben sich kaum merklich unterschiedliche Selektivitäten. Wenn beispielsweise basische Verbindungen über den pH-Wert neutralisiert werden, liegen diese als neutrale Moleküle vor, die Wechselwirkungen mit der stationären Phase sind hydrophober Natur und somit recht unspezifisch. Bei Optimierungsexperimenten und der Verwendung unterschiedlicher stationärer Phasen ergeben sich in solchen Fällen zwar unterschiedlich starke Wechselwirkungen und somit unterschiedliche Retentionszeiten/ k -Werte an den einzelnen Säulen, allerdings oft vergleichbare Selektivitäten, s. Abb. 1.1. Unterschiedliche k -Werte (s. Balken) jedoch ergeben bis auf die fluorierten Phasen sehr ähnliche α -Werte (s. Linie).

In solchen Situationen ist eine merkliche Verbesserung der Selektivität kaum realisierbar. Auch wenn es gelänge, die Selektivität an einer bestimmten Stelle des Chromatogramms zu verbessern, wird diese an anderer Stelle womöglich ver-

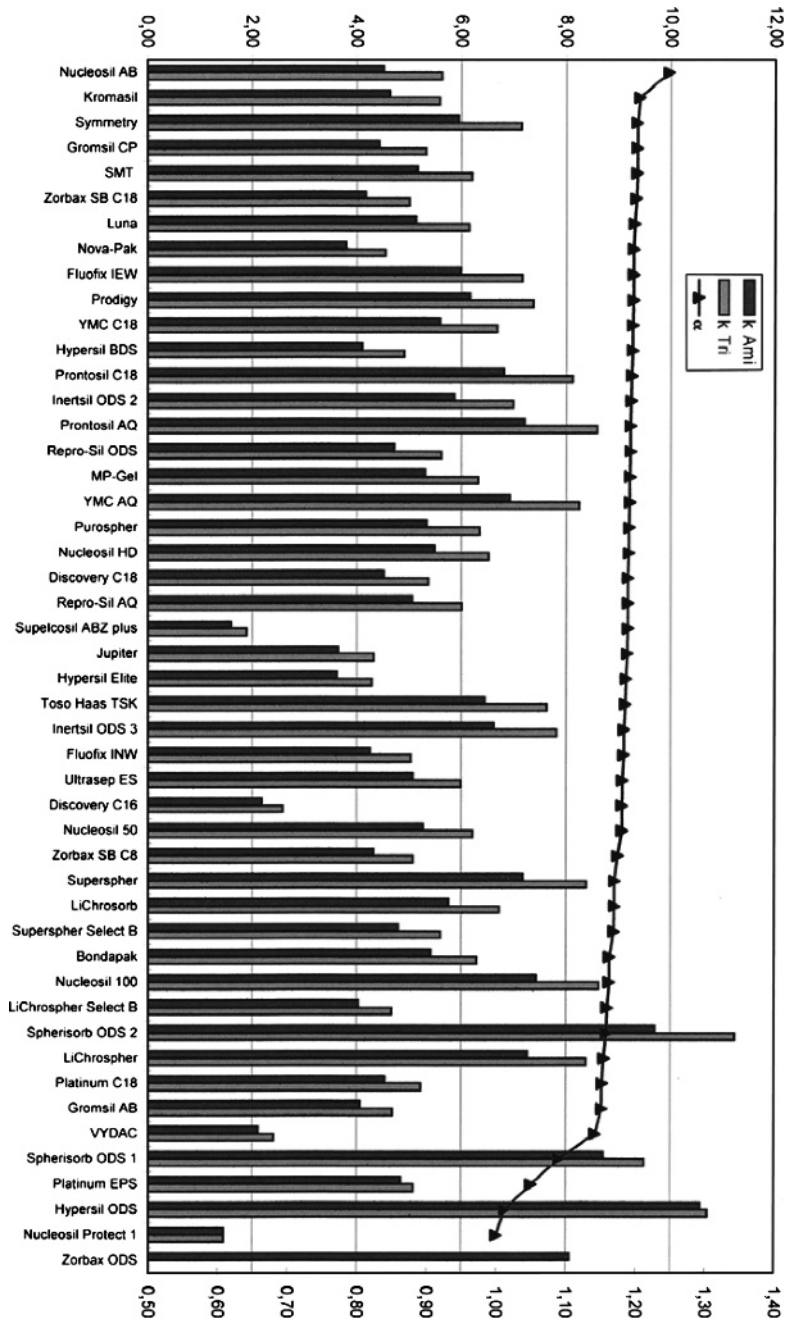


Abb. 1.1 Retentions- (Balken) und Trennfaktoren (Linie) von trizyklischen Antidepressiva im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer an unterschiedlichen RP-Phasen, Details s. Text.

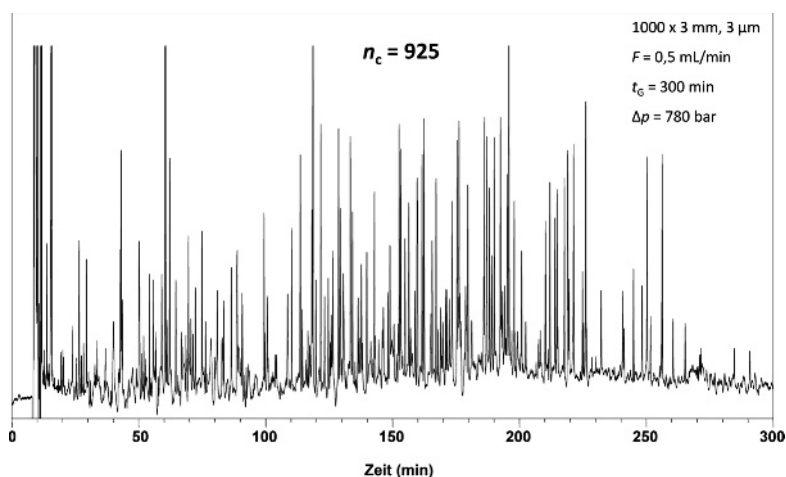


Abb. 1.2 Hochauflösende 1D-UHPLC-Trennung eines tryptischen Verdaus von fünf Proteinen. Eine Kette von vier 250 mm langen Säulen wurde mit totvolumenfreien Kopplungsstücken basierend auf Viper-

Verschraubungen (ThermoScientific) aufgebaut. Stationäre Phase: Acclaim 120 C18 (ThermoScientific), Temperatur: 30 °C, theoretische Peakkapazität berechnet aus der Peakbreite einzelner gut aufgelöster Peaks.

schlechtert. In einem Fall wie diesem rückt die Peakkapazität in den Fokus: möglichst schmale Peaks (d. h. maximal erzielbare „Bodenzahl“ N_{Gr}), am besten über das gesamte Chromatogramm gleichmäßig verteilt, s. als Beispiel Abb. 1.2, entnommen aus [6]. Hier wird eine Trennung mit einer (theoretischen) Peakkapazität von 925 Peaks bei einer Kopplung von vier Säulen à 250 mm gezeigt.

Bevor wir schauen, wie die UHPLC nutzbringend eingesetzt werden kann, halten wir anhand der Gl. (1.2) fest, wie die Peakkapazität prinzipiell erhöht werden kann:

1. Ich brauche einen langen Gradienten bzw. eine große Retentionszeitdifferenz zwischen dem letzten und dem ersten Peak. Das bedingt ein großes Gradientenvolumen, eventuell auch eine lange Säule.
2. Ich benötige eine kleine Peakbreite, d. h. ich strebe schmale Peaks an. Das erreiche ich durch einen steilen Gradienten, einen hohen Start- und auch einen hohen End% B, kleine Teilchen, geringe Viskosität, hohe Temperatur.

Die UHPLC beschert uns bekanntlich kleine Totvolumina und ermöglicht hohe Drücke, Folgendes wäre also bezogen auf letztgenannten Vorteil möglich: lange Säule oder serielle Kopplung mehrerer Säulen plus evtl. kleine Teilchen.

Merke

Wenn Säulen in Serie gekoppelt werden, minimiert sich der negative Einfluss des Totvolumens (Extra Column Effects). Dies macht sich erfahrungsgemäß trotz modernstem UHPLC-Design im Falle von isokratischen Trennungen und sehr kleinen Säulenvolumina durchaus bemerkbar, s. weiter unten im gleichen Abschnitt sowie Kapitel 3

und 4. Da ja bei Gradiententrennungen die Teilchengröße nicht so entscheidend ist, sähe eine Möglichkeit wie folgt aus:

3 Säulen à 150 mm × 3 mm, 2,5–3,5 µm-Teilchen in Serie plus 40–50 °C.

Eine Literaturrecherche ergab, dass immer häufiger Trennungen mit hoher Peakkapazität unter UHPLC-Bedingungen publiziert werden. Folgende Beispiele erscheinen für ein „Real Life“-Labor u. U. zunächst realisierbar:

2 Säulen à 150 mm, 1,9 µm, 1200 bar bei 45 °C:

480 Peaks in 40 min (12 Peaks/min),

3 Säulen à 150 mm, 2,6 µm Fused Core, 1200 bar bei 45 °C:

600 Peaks in 50 min (12 Peaks/min),

4 × 250 mm, 3,0 µm, 1200 bar bei 30 °C:

1000 Peaks in 300 min (3–4 Peaks/min).

Wenn die Zeit keinen wesentlichen limitierenden Faktor darstellt und die Matrix nicht außerordentlich schwierig ist (Polymere, Lebensmittel, Fermenterbrühe), sind ca. 600–1000 Peaks mittels UHPLC theoretisch trennbar, s. auch Kapitel 11. Für solche Fälle dürften mittelfristig lange Säulen mit einem 2,1 mm Innendurchmesser bei Verwendung von 1,5–2,6 µm Fused Core Material eine der interessantesten Möglichkeiten darstellen. Unter optimalen Bedingungen und mit modernster UHPLC-Hardware lautet das – sicherlich recht anspruchsvoll – avisierte Ziel, „100/100“: 100 Peaks/100 s, siehe dazu auch Abschnitt 12.3. Und: Je höher die Peakkapazität – möglich durch eine optimale Kombination „UHPLC-Anlage/Säule“ –, umso „überflüssiger“ wird eine gute Selektivität, deren Verbesserung insbesondere unter Zeitdruck nicht gerade ein triviales Unterfangen darstellt. Betrachten wir jetzt den Alltag: In einem realen Chromatogramm sind – bis vielleicht im Falle einer Probe, die ausschließlich Homologe enthält – die Peaks selten gleichmäßig verteilt. In diesem Fall – insbesondere wenn die Peaks noch quantifiziert werden sollten, d. h. eine Auflösung von 1,5 oder mindestens von 1,0 notwendig ist – kann in der Praxis nur eine wesentlich kleinere Peakkapazität erreicht werden. Laut statistischer Berechnungen wären bei einer theoretischen Peakkapazität von 1000 tatsächlich 184 Peaks zu trennen. Unter Berücksichtigung einer schwierigen Matrix und/oder einer evtl. suboptimalen Apparatur gilt als gute Faustregel für die Anzahl der zu trennenden Peaks ca. 1/10 der theoretischen Peakkapazität. Bezogen auf das zuletzt angegebene Zahlenbeispiel wären dies real ca. 100 Peaks. Halten wir vereinfacht fest: Für recht anspruchsvolle Fragestellungen (Multikomponentenproben und/oder komplexe Matrix) ist das bestmögliche Mittel die 2D-Chromatographie mit orthogonalen Trennmechanismen (s. Kapitel 6), das nächstbeste ist die moderne UHPLC, welche eindimensional für quantitative Zwecke eine tatsächliche Peakkapazität von ca. 100 ermöglichen kann.

Auch hier könnte man versuchen, sich möglichst viele Parameter, die einen Beitrag für eine gute Peakkapazität leisten können, gleichzeitig zunutze zu machen. Folgende Variante entspräche einer „optimalen“ Kombination:

Lange Säule (oder mehrere Säulen in Serie), 2–3 μm -Teilchen (porös oder Fused Core), hoher Fluss, 50–60 °C, Acetonitril als organisches Lösemittel, Gradient bei ca. 40 % B beginnend. Bei ionischen Komponenten kann ferner versucht werden, über den pH-Wert eine gute Peaksymmetrie zu erreichen. Je nach Mechanismus kann ein steiler Gradient, bisweilen aber auch ein flacher von Vorteil sein.

Säulenlänge und Gradientendauer haben eines gemeinsam: Beide beeinflussen bei gegebenem Fluss die Peakkapazität nicht so stark wie allgemein angenommen wird. So sind beispielsweise Gradienten länger als ca. 20–25 min nur im Falle von sehr komplexen Gemischen sinnvoll.

Merke

Merke bezüglich Säulenlänge und Gradientendauer folgende vereinfachte Faustregeln für eine optimale Peakkapazität:

- 50 mm $\leq$ 5 min
- 100 mm $\approx$ 10–20 min
- 150 mm $\geq$ 20 min.

Es sei in diesem Zusammenhang an die Ausführungen weiter oben erinnert: Erstens stellt die Erhöhung der Bodenzahl nicht gerade den effektivsten Weg dar, die Auflösung zu verbessern. Zweitens ergeben sich bei Gradiententrennungen ohnehin schmale Peaks, eine hohe „Bodenzahl“ N_{Gr} hat nur in schwierigen Fällen – wenn es z. B. auf eine hohe Peakkapazität kommt – eine Relevanz. Und: Eine Abnahme der Teilchengröße um Faktor 2 führte bei einem um Faktor 4 erhöhten Druck zu einer Verbesserung der Auflösung um Faktor ca. 1,4. Eine Verlängerung der Säule um Faktor 2 führte ebenso zu einer Verbesserung der Auflösung um Faktor ca. 1,4 – bei einem allerdings nur um Faktor 2 erhöhten Druck (und einer längeren Analysendauer). Denn: Die Säulenlänge verhält sich zum Druck linear, die Teilchengröße dagegen quadratisch. Verlängere ich also weiterhin die Säule (oder verwende eine Säulenkopplung), erreiche ich bis zu einem gegebenen/kritischen Druck eine wesentlich größere Anzahl an Böden. Wenn also das ultimative Ziel „maximale Bodenzahl“ lautet (kritisch hinterfragen!), dann sollte ich mehrere Säulen, gefüllt mit 2,5–3,5 μm -Teilchen in Serie schalten – die lange Retentionszeit müsste ich in diesem Fall in Kauf nehmen. Das heißt den Druck, den mir die UHPLC ermöglicht, sollte ich eher für lange Säulen als für kleine Teilchen nutzen, s. auch Kapitel 11. Zur Veranschaulichung folgen nun einige Zahlenbeispiele:

- Eine 150 mm, 5 μm -Säule liefert 9000 Böden, der Druckabfall beträgt 150 bar. Als Auflösung ergibt sich $R = 1,20$, die Retentionszeit beträgt 12 min. Die Auflösung soll durch Erhöhung der Bodenzahl auf beispielsweise $R = 2,16$ verbessert werden. Um diesen Wert zu erreichen, sind 36 000 Böden nötig. Bei

dieser Säulenlänge wären dafür $1,3\text{ }\mu\text{m}$ -Teilchen notwendig, der sich ergebende Druck betrüge ca. 2400 bar ($8 \times 150\text{ bar}$) – und dies ist in absehbarer Zeit unter realen Bedingungen nicht machbar. Vier Säulen à 150 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$, in Serie liefern ebenso 36 000 Böden – und dies bei einer Retentionszeit von 48 min und einem Druck von 600 bar ($4 \times 150\text{ bar}$). Die gewünschte Auflösung wird somit erreicht. Alternativ könnte man in einem Schritt die Säulenlänge „etwas“ erhöhen und die Teilchengröße „etwas“ erniedrigen: Man koppelt zwei Säulen à 150 mm, gefüllt mit $2,5\text{ }\mu\text{m}$ -Teilchen, in Serie, Ergebnis: gewünschte Auflösung von $R = 2,16$ in 24 min bei einem Druck von 1200 bar. Kurzum: Ohne eine wie auch immer zu realisierende „lange“ Säule (längere Säule, Säulenkopplung) ist eine merkliche Verbesserung der Auflösung über die Bodenzahl nicht möglich. Vereinfacht: Eine längere Säule ist effektiver als kleinere Teilchen (in diesem Zusammenhang kommen den Fused Core-Teilchen eine gewichtige Bedeutung zu), dies sollte man sich bei den Bemühungen um eine Verbesserung der Peakkapazität merken.

- Eine übliche UHPLC-Säule, $100\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$, $1,7\text{ }\mu\text{m}$, liefert bei einem Druck von ca. 1000 bar ca. 20 000–25 000 Böden. Wenn der Druck von ca. 1000 bar als Limit für Dauerbelastung in der Routine angesehen werden sollte, erkennt man schnell – trotz UHPLC – die Grenzen der kleinen Teilchen als Lieferant maximaler Effizienz. Somit wird auch ersichtlich, dass die UHPLC unter üblichen Bedingungen nicht die Auflösung liefern kann, die für schwierige Trennungen notwendig wäre.
- Vier Säulen à $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, in Serie liefern ca. 100 000 Böden – bei einem Druck von ca. 600 bar (eine interessante Variante wäre, zusätzlich die Temperatur auf 80°C zu setzen: hervorragende Peakkapazität bei moderatem Druck). *Bemerkung:* Bei Trennungen unter „Ultra High Resolution Separation“-Bedingungen (Bodenzahl $> 150\,000$ Böden) sollte die Temperatur nicht erhöht werden – dies würde sich negativ auf den B-Term der Van-Deemter-Gleichung auswirken und das Ergebnis wäre eine erhöhte Diffusion.
- Eine $250\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$, $1,9\text{ }\mu\text{m}$ -Säule liefert ca. 55 000 Böden – bei einem Druckabfall von ca. 960 bar. Diese Bodenzahl dürfte heute in etwa die maximale Bodenzahl sein, die unter realen Bedingungen mit einer Säule erreicht werden kann – und das ist in einer annehmbaren Retentionszeit nur unter UHPLC-Bedingungen möglich.

Zusammenfassend lautet das Fazit bezüglich Säulenlänge, Bodenzahl und Druck:

Doppelte Säulenlänge führt zu doppeltem Druck und zu einer Verbesserung der Auflösung/Peakkapazität um Faktor ca. 1,4. Halb so große Teilchen führen zu vierfachem Druck und ebenfalls zu einer Verbesserung der Auflösung/Peakkapazität um Faktor ca. 1,4. Daraus folgt, dass ich bei einem gegebenen Druck die Bodenzahl durch eine längere Säule (oder eine serielle Kopplung) stärker erhöhe als durch kleinere Teilchen. Noch einmal: Bei Gradiententrennungen stellen beide – sowohl die längere(n) Säule(n) als auch die kleinen Teilchen – bis auf folgende Fälle keine zwingenden Notwendigkeiten dar: sehr viele, sehr

ähnliche Komponenten (lange Säule), sehr langsame Kinetik, geringe Massensensitivität (kleine Teilchen).

Es sei in diesem Zusammenhang auch an die Erfahrung erinnert, die nach 50 Jahren HPLC immer noch Gültigkeit hat: Eine $250 \times 4,6$ mm-Säule lässt sich besser und reproduzierbarer als eine kurze und vor allem eine dünne Säule packen. Weiterer Vorteil der langen Säule: die lange Lebensdauer. Nachteile: lange Läufe, hoher Lösemittelverbrauch – beides auf Dauer nicht zu unterschätzen.

■ **Bemerkung 1**

Wie wir weiter oben gesehen haben, sind weder eine gute Packungsqualität noch kleine Teilchen ein Garant für eine gute Peakform, u. a. kann das Totvolumen eine gewichtige Rolle spielen: Bei $\leq 1,7$ μm -Teilchen nimmt die Bodenzahl bei den später eluierenden Peaks oft zu, ebenso die Peaksymmetrie. Das ist ein Beleg dafür, dass die heutigen UHPLC-Geräte ein viel zu großes Totvolumen aufweisen, um die Effizienz kleiner Teilchen auszunutzen zu können. Weiterer Hinweis für diesen Sachverhalt: Die Auflösung von früh eluierenden Peaks an 5 μm -Säulen ist oft besser als an ≤ 2 μm -Säulen.

■ **Bemerkung 2**

Wie weiter oben angemerkt, sind bei Gradiententrennungen weder die Länge der Säule noch die Gradientendauer oder die Teilchengröße von entscheidender Bedeutung – eher das Gradientenvolumen, Start- und End% B sowie die Steilheit. Gerade bei Gradiententrennungen sind „echte“ UHPLC-Bedingungen nur für recht anspruchsvolle Trennprobleme (z. B. komplexes Gemisch, hohe Peakkapazität gewünscht) und/oder für Fälle gefragt, in denen mehrere Parameter gleichzeitig verändert werden sollen, dabei aber der Druck erhöht wird. Sind beispielsweise im Falle von polaren Komponenten sowohl die Selektivität als auch die Peakkapazität zu verbessern, könnte man wie folgt vorgehen: lange Säule (oder mehrere Säulen in Serie) mit 2–3 μm -Teilchen verwenden, hohen Fluss, 40–50 °C, plus Methanol und alternativ zu einer Temperaturerhöhung auch einen Lauf bei 10–15 °C testen. Gerade für solche in kurzer Zeit ausgeführte Experimente kann die UHPLC ihre Stärke ausspielen.

1.2.2

Schnell trennen

Gleich vorweg: Ist die Selektivität sehr gut, könnte man einfach HPLC „machen“ und eine 3 mm, 5 μm -Säule bei recht hohem Fluss betreiben; man erreicht so in jedem Fall eine schnellere Trennung als unter UHPLC-Bedingungen.

■ **Merke**

Die wegen des hohen Flusses „niedrige“ Bodenzahl fällt hier aufgrund der guten Selektivität kaum ins Gewicht, Letztere beschert uns in der Regel eine ausreichende Auflösung.

Die Stärke „par excellence“ der UHPLC liegt eher in folgender Situation: Ist die verwendete Säule annähernd optimal selektiv, erhält man eine genügend gute

Auflösung in kurzer Zeit oder anders formuliert: Ich bekomme unter UHPLC-Bedingungen das beste Bodenzahl/Zeit-Verhältnis – d. h. die geringste Retentionszeit bei einer gegebenen Effizienz und erziele zusätzlich einen geringen Lösemittelverbrauch. Eine Abnahme der Säulenlänge bei gleichzeitiger Abnahme der Teilchengröße führt bei einem geringeren Lösemittelverbrauch zur „identischen“ Trennung in einer kürzeren Zeit. Voraussetzungen für eine „identische“ Trennung: gleich gut gepackte Säule, keine merkliche Abnahme der Bodenzahl aufgrund der breiteren Korngrößenverteilung bei Teilchen $\leq$ ca. $1,7 \mu\text{m}$, keine Verschlechterung der Peakform (sprich: Tailing) – vor allem bei den früh eluierenden Peaks aufgrund von Totvolumina im isokratischen Modus. Anders formuliert: Bei konstant gehaltener Säulenlänge und kleineren Teilchen erziele ich durch die Erhöhung der Bodenzahl in gleicher Retentionszeit eine Verbesserung der Auflösung. Hier könnte ich sogar gleichzeitig die Retentionszeit verkürzen, da ich gemäß H/u-Kurve bei den nun kleineren Teilchen den Fluss ohne merklichen Verlust an Effizienz erhöhen kann.

Merke jedoch

Die Fläche nimmt bei konzentrationsempfindlichen Detektoren ab, was im Spurenbereich als kritisch anzusehen ist. Eine Erhöhung des Flusses ist selbstverständlich nur dann sinnvoll, wenn bei der Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase sich eine schnelle Kinetik und somit ein kleiner C-Term der Van-Deemter-Gleichung ergibt. Zu diesen Zusammenhängen folgende Bemerkung: Sie stellen weder neue Erkenntnisse dar noch wird dafür unbedingt eine UHPLC benötigt, denn solche Verbesserungen sind – zumindest teilweise – bis zu einem Druck von 400 bar an einer klassischen HPLC-Anlage durchaus umsetzbar. Allerdings wagt man sich erst seit Markteinführung der UHPLC-Technologie Mitte der 2000er Jahre bei höheren Drücken zu arbeiten.

Für „schnelles Trennen“ und UHPLC lässt sich folgendes Fazit ziehen:

1. Lautet das Ziel „schnell trennen“, eignet sich die UHPLC hervorragend, wenn erstens das Trennproblem nicht sehr anspruchsvoll ist ($\leq$ ca. 15–20 Peaks), zweitens gleichbleibende, einfache, robuste chromatographische Bedingungen vorhanden sind und drittens ein automatisierter und konstanter Ablauf herrscht. Als typisches Anwendungsgebiet wäre hier die IPC (In Process Control) zu nennen.
2. Ebenso eignet sich die UHPLC, wenn ich in kurzer Zeit Methoden entwickeln/Trends erkennen bzw. bestehende Methoden unter Veränderung diverser Parameter optimieren möchte. Die UHPLC erlaubt möglichst viele Parameter schnell zu testen, da kurze Gradientenläufe mit kurzen Säulen bei genügend guter Auflösung/Peakkapazität möglich sind: Die UHPLC ist für Entwicklungsabteilungen prädestiniert, welche unter Zeitdruck Methoden mit wechselnden Parametern oder auch mithilfe von generischen Läufen entwickeln bzw. optimieren müssen.

1.2.3

Massenempfindlichkeit verbessern (konstantes Injektionsvolumen)

Dies dürfte der einfachste Fall sein, denn das Ziel ist klar definiert: Die Quantifizierung von kleinen Peaks bei gegebener, limitierter Probenmenge – also, wenn ich nicht mehr injizieren kann/darf. Ebenso klar ist auch, was die UHPLC mit ihren Charakteristika beitragen kann. Folgendes ist recht einfach umzusetzen:

- Die Verringerung des Innendurchmessers in Kombination mit kleinen Teilchen führt zu einer Verbesserung der Massenempfindlichkeit.
- Eine kürzere Säule mit kleineren Teilchen führt ebenso zu einem kleineren Peakvolumen.

In diesem Zusammenhang sollte man jedoch an folgende praktischen Aspekte denken:

Eine Verringerung des Säuleninnendurchmessers von z. B. 2 mm auf 1 mm würde zwar bei einem um Faktor 4 erhöhten Druck zu einer Verbesserung der relativen Massenempfindlichkeit um ca. einen Faktor 20 führen. Es ist allerdings nicht gerade trivial, eine 1 mm Kapillare „gut“ und reproduzierbar zu packen – sowohl mit porösen als auch – im Besonderen! – mit Fused Core Materialien, s. auch Ausführungen in Abschnitt 9.7. Ferner besteht bei der NebenkompONENTENANALYSE an dünnen Säulen/Kapillaren die Gefahr der Säulenüberladung durch den Hauptpeak/die Matrix. Und schließlich: Auch die modernsten UHPLC-Anlagen müssen hier bezüglich Totvolumina nachträglich optimiert werden – möchte man in diese Regionen vordringen. Das bedeutet: Wenn bezüglich Massenempfindlichkeit nicht unbedingt alles gewonnen werden muss, wäre folgende Säule unter Alltagsbedingungen gut geeignet: 2,1 mm, 1,5–1,7 μm -Teilchen; bei matrixfreien Probenlösungen und optimaler Hardware unter Umständen 1,3 μm -Teilchen. Sollte die Massenempfindlichkeit weiterhin verbessert werden, stößt die UHPLC an ihre Grenze, hier schlägt die Stunde der Nano- bzw. Kapillar-LC, s. Kapitel 6. Folgende Punkte sind zwar nicht UHPLC-spezifisch, jedoch wichtig für eine gute Empfindlichkeit (sprich: schmale Peaks), daher findet hier eine kurze Erwähnung statt:

- Die Probenlösung sollte schwächer – d. h. in der RP-HPLC polarer – als der Anfangseluent sein, das bedeutet: Probenlösung mit Wasser verdünnen, evtl. mit Neutralsalz versetzen, woraufhin eine Anreicherung am Säulenkopf erfolgt (On Column Concentration).
- Bei sehr früh eluierenden, chemisch ähnlichen Peaks: Gradienten mit reichlich Wasser/Puffer starten, evtl. eine kurze isokratische Stufe einbauen. Auch hier ist eine Anreicherung möglich.
- Bei einfachen Trennungen und nicht allzu polaren Komponenten mit 50–70 % B starten und einen steilen Gradienten fahren, s. Abb. 1.3.

Wir beenden diesen Abschnitt mit folgendem Hinweis: Optimale Einstellparameter wie Datenrateaufnahme (Sample Rate), Zeitkonstante (Time Constant/Response Time) etc. sind bei hohen Flüssen und bei früh eluierenden, schmalen,

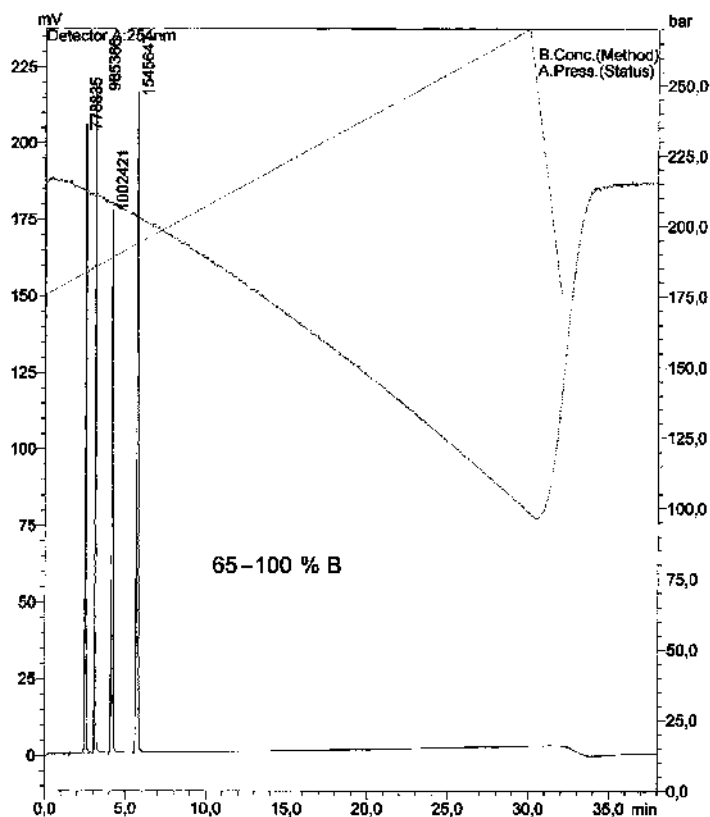


Abb. 1.3 Startbedingungen beim Gradienten mit dem Ziel: Verbesserung der Peakform; Säule, GeminiNX, 50 × 4 mm, 3 µm, 65–100 % B (Acetonitril/Wasser).

kleinen Peaks überaus wichtig; umso mehr unter UHPLC-Bedingungen *und* dem Bestreben nach guter Massensensitivität. Zu geeigneten Zahlenwerten, s. Abschnitt 1.3

■ Bemerkung

Im Zusammenhang mit den Vorteilen der UHPLC ist immer wieder davon die Rede, dass die „Empfindlichkeit“ in der UHPLC im Vergleich zur HPLC besser sei. Ist allerdings die Nachweisempfindlichkeit gemeint, ist das Gegenteil der Fall! Erläuterung: Verwendet man eine konventionelle Säule, kann bei einem DAD als konzentrationsempfindlichem Detektor eine Detektorzelle mit einer langen Wegstrecke verwendet werden. Denn: Lambert-Beer „verlangt“ nach einem langen Lichtweg. Die Gefahr, dass die Empfindlichkeit durch Totvolumina zunichte gemacht wird, besteht aufgrund des im Vergleich zu dem Zellvolumen großen Säulenvolumens kaum. Bekanntlich sollte ferner das Injektionsvolumen höchstens 10% des Säulenvolumens betragen, bei niedrigen Retentionsfaktoren macht sich eine Bandenverbreiterung bereits ab 1 % Injektionsvolumen bemerkbar. Bei einer konventionellen Säule ist es somit unproblematisch.

tisch, größere Injektionsvolumina zu verwenden. Bei den in der UHPLC verwendeten kleinvolumigen Säulen dagegen, sollte das Injektionsvolumen 1–2 µL nicht übersteigen. Aus dem gleichen Grunde (kleines Säulenvolumen) muss in der UHPLC das Totvolumen und folglich das Detektorzellvolumen klein sein. Trotz in jüngster Zeit merklichen Fortschritten des Zelldesigns (Abschnitt 2.1, Kapitel 12), kann der Lichtweg in einer Detektorzelle mit einem in der UHPLC weit unter 1 µL notwendigen Zellvolumen nicht signifikant verlängert werden. Aus diesen Gründen ist die UHPLC *per se* unempfindlicher als die HPLC, gemeint ist hier die Nachweisempfindlichkeit. Wenn allerdings das Injektionsvolumen von vornherein klein ist bzw. nicht erhöht werden kann/darf, ist die UHPLC zweifelsohne im Vorteil: Die Massensensitivität ist in einer (optimierten) UHPLC-Anlage wegen des kleinen Peakvolumens um Größen besser als in der HPLC.

1.2.4

Robuste Trennungen gewährleisten

In einem Routinelabor steht die Robustheit der Methode an erster Stelle und die Ausfallzeiten sollten auf ein Minimum reduziert werden. Im Falle von einfachen chromatographischen Methoden, großer Probenanzahl, robusten Bedingungen, klaren Probenlösungen, keiner/minimaler Probenvorbereitung, automatischer Integration usw. – s. weiter oben im gleichen Abschnitt – käme die UHPLC zweifelsohne in Frage. In folgenden Fällen sollte der Einsatz einer UHPLC-Anlage jedoch kritisch hinterfragt werden:

- Schwierige Matrix; die Probenvorbereitung führt nicht zu homogenen, klaren, Probenlösungen, jene sind womöglich matrixbelastet (Pflanzenextrakte, kontaminierte Böden, Dragees, Salben, Polymere, biologische Matrix wie Gewebe, Vollblut usw.).

Bevor wir zu weiteren kritischen Punkten bezüglich eines sinnvollen Einsatzes der UHPLC kommen, folgt ein Beispiel für die Nichteignung der UHPLC: Nehmen wir an, dass die interessierende(n) Komponente(n) nur in Acetonitril, Alkoholen oder Tetrahydrofuran aufzulösen bzw. damit zu extrahieren ist/sind. Somit ist die Probenlösung stärker (sprich: organischer) als der Eluent/Anfangsgradient. Dies ist in bestimmten Bereichen – wie Pharma und Umweltanalytik – nicht zu vermeiden. Ein typisches Beispiel wäre das Herausextrahieren/Aufnehmen des Wirkstoffs mit ethanolischen Lösungen (Salbenanalytik). In diesem Falle haben wir mit Fronting zu kämpfen, im „worst case“ entstehen sogar Doppelpeaks. Aufgrund der kleinen Säulenvolumina in der UHPLC (z. B. für eine 5 mm × 2,1 mm-Säule ca. 200 µL) bleibt die schlechte Peakform bestehen: Die „verlorene“ Bodenzahl bleibt in der UHPLC endgültig verloren! Etwas vereinfacht kann man wie folgt festhalten: Eine matrixbelastete Probe und/oder ein starkes Lösemittel lassen jede UHPLC scheitern. Bei konventionellen Säulen (Säule länger/dicker und somit größeres Säulenvolumen) besteht das Problem in der Regel lediglich bei den früh eluierenden Peaks und bei Injektionsvolumina ab ca. 15–20 µL.

- Variierende chromatographische Bedingungen im Alltag, mangelnde Robustheit der Methode(n).
- Die Probenvorbereitung, die manuelle Integration und weitere notwendige Schritte wie Dokumentation, Ablage etc. machen ein Vielfaches der Trennzeit aus.
- Die Probenanzahl ist überschaubar.
- Häufige Methodentransfers mit mehreren Labors und erwarteten Unterschieden im Ablauf, im „Know-how“ und in der „Kultur“. Dazu ein paar Beispiele: Ein weniger erfahrener HPLC-Anwender nimmt einfach eine „andere“ Kapillare, schneidet sie unsachgemäß ab, verbindet einen PEEK-Fitting mit einer Stahlkapillare, verwendet einen Säulenwechsler oder benutzt ein Verbindungsstück zwischen Säule und Detektor, um Säulen von unterschiedlichen Anbietern direkt einbauen zu können usw. Solche Dinge „verzeiht“ die UHPLC nicht, die HPLC schon eher.

Betrachten wir ein fiktives Labor in der Qualitätskontrolle eines Pharmaunternehmens/Generikaherstellers, in dem Tabletten, Kapseln oder Salben analysiert werden. Zugegeben simplifiziert, sieht die Situation oft in etwa wie folgt aus: Ein Anwender betreut womöglich 2–3 HPLC-Anlagen und/oder hat nebenbei weitere Aufgaben zu erledigen (Dokumentation u. Ä.). Die Methoden sind alt: LiChrospher/Nucleosil 100/Hypersil ODS/Select B etc., Phosphatpuffer, evtl. Triethylamin oder Ionenpaarreagenzien usw., es verläuft nicht immer reibungslos. Oft herrscht Zeitdruck, nach einem Geräteausfall – aus welchen Gründen auch immer – muss das Gerät requalifiziert werden oder es ist wenigstens mithilfe von Systemeignungstests eventuell inklusive Wiederholinjektionen der einwandfreie Zustand des Gerätes nachzuweisen. Und vor dem anstehenden Methodentransfer hat man jetzt schon ein ungutes Gefühl, da ein solcher erfahrungsgemäß selten ohne Komplikationen vonstattengeht.

Die Einwände bei den Überlegungen zur eventuellen Einführung einer UHPLC könnten in etwa lauten: „Bringt es wirklich viel, wenn wir die Retentionszeit von 20 min auf ca. 6 min reduzieren, wenn die Probenvorbereitung eine halbe Stunde dauert und die oft notwendige manuelle Integration mindestens ebenso lange, vom Sichten der einzelnen Chromatogramme ganz zu schweigen? Und was hilft es uns, wenn die Analysenserie einerseits statt um 5:00 Uhr morgens bereits um 23:00 Uhr nachts beendet ist, das Gerät aber andererseits öfters aussteigt und wir noch mehr Zeit wegen der Reparatur und der nachfolgenden Requalifizierung verlieren? Und was den Lösemittelverbrauch anbetrifft: Im Labor geht es um Liter, in der Produktion um Hunderte von Litern. Und mit der Lebensdauer von UHPLC-Säulen waren wir während der Testphase mit der UHPLC sowieso unzufrieden.“ Diese Argumentation lässt sich sicherlich mehr oder weniger nachvollziehen – bis vielleicht auf den letzten Punkt. Nicht die Lebensdauer absolut ist relevant, sondern die Anzahl der Injektionen pro Zeiteinheit bzw. die Anzahl der Säulenvolumina, bis die Säule unbrauchbar wird. Letzteres Kriterium zugrunde gelegt (Matrixproblematik usw. ausgenommen), zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen HPLC- und UHPLC-Säulen festgestellt wird. Sollte nun in diesem Umfeld ohne Änderung der Arbeits- und Denkweise sowie der Erwar-

tungen eine UHPLC eingesetzt werden, könnte manch Unangenehmes passieren, nachfolgend nur drei Beispiele:

- Ein Salzkriställchen aus dem nicht filtrierten Puffer oder ein Bestandteil der Matrix kann die in der UHPLC verwendeten dünnen Kapillaren verstopfen, Ergebnis: Undichtigkeiten oder das Gerät steigt im „worst case“ sogar aus.
- Ebenso leicht kann der – bei den in der UHPLC verwendeten ca. $\leq 1,9 \mu\text{m}$ -Teilchen sehr kleine – Zwischenkornbereich (Bereich in der Säule zwischen den einzelnen Teilchen) verstopfen.
- Man findet keine UHPLC-Säule mit vergleichbaren Eigenschaften, wie die in der Methode angegebene Säule.
- Methodentransfer: Wenn als SST-Kriterien neben Auflösung beispielsweise auch Asymmetriefaktor und relative Retentionszeit, statt relative Retention [8] festgelegt wurden, ist es oft recht schwierig diese zu erreichen – trotz vorhandener Softwaretools aus der Literatur bzw. der Gerätehersteller zur Skalierung von Methodenparametern. Auf die Problematik von Methodentransfers wird hier nicht näher eingegangen, vielmehr wird auf Kapitel 4 verwiesen, hier lediglich folgender Hinweis:

Beim Übertragen einer HPLC-Methode in eine UHPLC ist oft eine gründlichere Probenvorbereitung vonnöten, s. weiter oben im gleichen Abschnitt. Dazu als Denkanstoß folgendes, stark vereinfachtes Schema:

HPLC: 3 min Probenvorbereitung + 15 min Analysenzeit = 18 min gesamt
UHPLC: 15 min Probenvorbereitung (wegen erhöhten Aufwandes und erhöhter Gründlichkeit) + 3 min Analysenzeit = 18 min gesamt.

Was ist „besser“?

Abhängig vom individuellen Fall kann die Präzision, aber auch der Kostenaspekt im ersten oder im zweiten Fall günstiger sein, Entscheidungen können nur von Fall zu Fall getroffen werden.

Mit jedem funktionierenden, klassischen HPLC-Gerät sind Verbesserungen in jeglicher Richtung möglich. Die nachfolgenden Abb. 1.4 und 1.5 verdeutlichen, dass an alten HPLC-Gradientenanlagen ohne merklichen Verlust an Auflösung und unter Einhaltung der SST-Kriterien beispielsweise eine merkliche Zeitersparnis erreicht werden kann.

1.3

Die UHPLC im Alltag

Es folgt eine kurze, vereinfacht dargestellte Beschreibung des UHPLC-Einsatzes im Alltag. Wie eingangs erwähnt, werden seit Mitte der 2000er Jahre immer mehr UHPLC-Anlagen eingesetzt – sowohl mit zufriedenen als auch mit weniger zufriedenen Anwendern. Zufriedene Anwender in Routinelabors sind solche, die erstens unter UHPLC-Bedingungen eine chromatographisch relativ einfache Fragestellung ($\leq$ ca. 20–25 Komponenten mit recht unterschiedlichen Eigen-

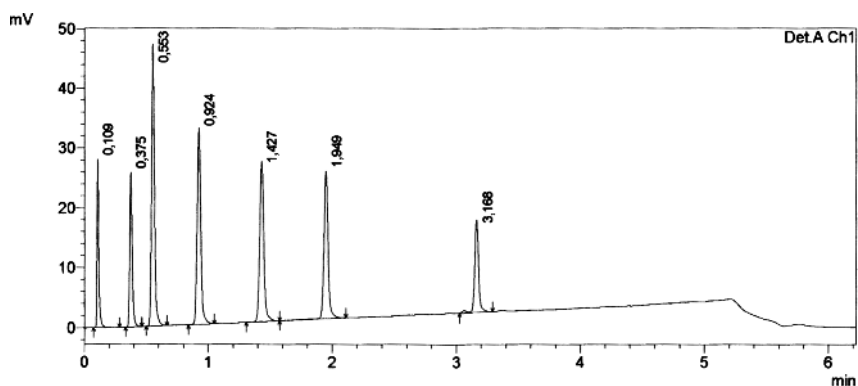


Abb. 1.4 Trennung von 7 Komponenten an einer Synergi MAX RP 20 × 4 mm, 2 µm-Säule, in etwas mehr als 3 min an einem Hochdruckgradient aus Anfang der 1990er Jahre; das Gerät wies ein beträchtliches Totvolumen aus.

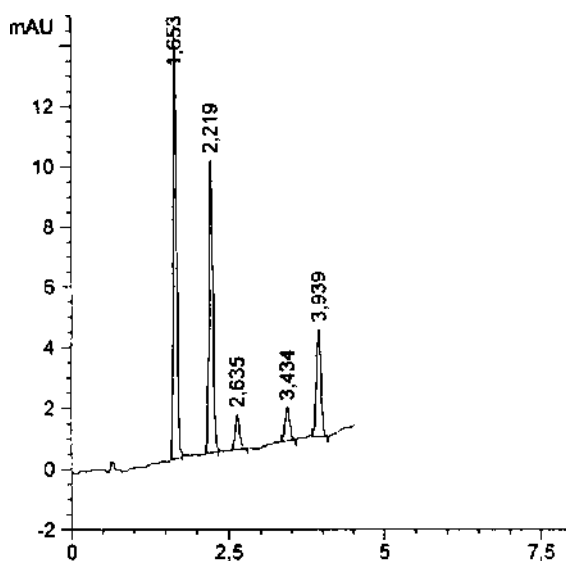


Abb. 1.5 Trennung von 5 Komponenten an einer 10 × 20 mm, 3 µm-Vorsäule, an einem Hochdruckgradient aus Anfang der 1990er Jahre; das Gerät wies ein beträchtliches Totvolumen aus.

schaften) bei gleichbleibenden, stabilen Bedingungen bearbeiten. Oder zweitens solche, die ihre UHPLC-Anlage lediglich als schnelle HPLC betreiben, weil sie – aus welchen Gründen auch immer – die Möglichkeiten ihrer HPLC für schnelle Trennungen in der Vergangenheit nicht genutzt hatten. Letztere UHPLC-Besitzer sind zwar keine UHPLC-Anwender im eigentlichen Sinne, aber sie sind zufrieden – „so what“? Beide Anwendergruppen sind zu Recht erfreut über die schnellen Trennungen, die schmalen Peaks und den reduzierten Lösemittelverbrauch. Die Zufriedenheit der Anwender in Entwicklungslabors rührt daher, dass

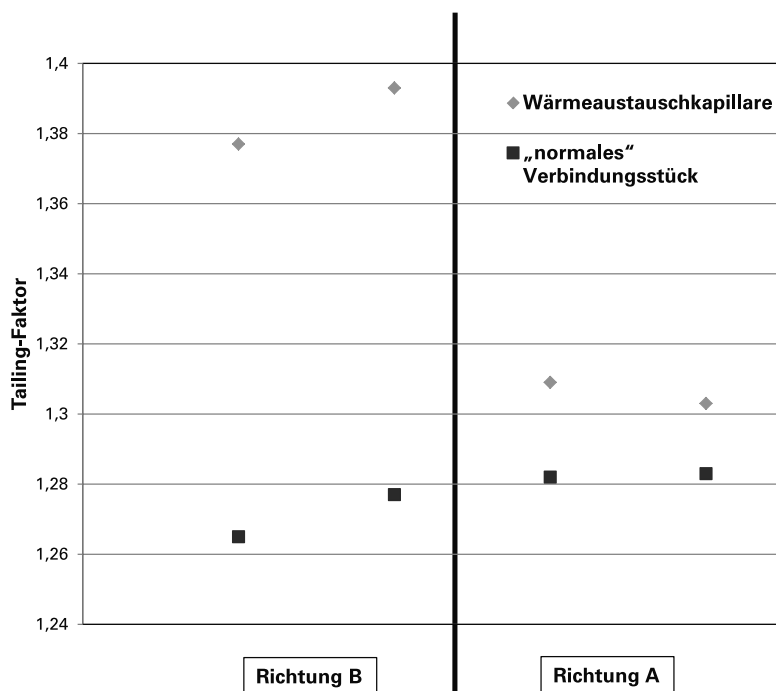


Abb. 1.6 Tailing-Faktor, abhängig von der Richtung der eingebauten Kapillare, für Details s. Text.

man in kurzer Zeit viele Optimierungsexperimente durchführen kann – und das macht in der Tat richtig Spaß! Unzufriedene UHPLC-Anwender sind in erster Linie solche, die mit ihrer HPLC-Anlage jahrelang ob der relativ geringen Probleme verwöhnt waren und mit einem UHPLC-Gerät jetzt mit solchen im Alltag massiv konfrontiert sind. Lösungen und Chemikalien müssen besonders rein sein bzw. eventuell extra filtriert werden, die Undichtigkeiten am Probengeber sind ein Ärgernis, „gute“ Säulen zeigen auf einmal in der UHPLC Doppelpeaks. Im Falle von früh eluierenden Peaks müssen die Einstellparameter (Datenrateaufnahme, Zeitkonstante etc.) angepasst werden usw. Kurzum: Man trauert der „alten“, guten Zeit mit den robusten HPLC-Geräten nach. Auch eine nur andersherum eingebaute Kapillare kann die Peaksymmetrie beeinflussen – und dies nicht nur für $\leq 2 \mu\text{m}$ -Teilchen und 2,1 mm Innendurchmesser. Um das zu verifizieren, haben wir in einem Experiment neben UHPLC-Säulen auch eine 50 mm $\times$ 4,6 mm, 3 μm -Säule verwendet, s. Abb. 1.6. Es wurde in einer UHPLC-Anlage einmal die vorhandene 0,10 mm ID-Kapillare als Verbindungsstück zwischen der Säule und dem Detektor und alternativ eine Wärmeaustauschkapillare, ca. 20 cm, 0,10 mm ID verwendet. Durch das etwas größere Volumen der Wärmeaustauschkapillare ergab sich ein nur minimal größerer Tailing-Faktor, s. Abb. 1.6 (Richtung A): statt ca. 1,28 nun ca. 1,30–1,31 – also nicht nennenswert.

Anschließend wurden sowohl das Verbindungsstück als auch die Wärmeaustauschkapillare „andersherum“ angeschlossen und die sich ergebenden Tailing-Faktoren durch Doppelbestimmung verglichen, s. Abb. 1.6, (Richtung B): Während der Tailing-Faktor im Falle des Verbindungsstückes praktisch gleich geblieben ist (ca. 1,26–1,28), erhöhte sich im Falle der Wärmeaustauschkapillare der Tailing-Faktor von ca. 1,30–1,31 auf ca. 1,38–1,40.

Ergebnis

Auch bei einem konstant gebliebenen Volumen einer Kapillare kann ein etwas „schlechterer“ Anschluss an einem Ende der Kapillare die Peaksymmetrie beeinträchtigen. Ein derartiger Effekt ist bei den üblichen, längeren HPLC-Säulen in HPLC-Anlagen kaum feststellbar.

Kurzum: Wenn ich meine UHPLC im realen Umfeld tatsächlich als UHPLC betreiben möchte, müsste ich gegenüber meinen früheren HPLC-Gewohnheiten Aufwand und Sorgfalt erhöhen – oder ich bleibe doch bei einem Druck unter ca. 600–650 bar und habe sicherlich geringere Probleme im Alltag.

Halten wir wie folgt fest: In einem stark regulierten Umfeld steht an erster Stelle zweifelsohne die Bestätigung der erwarteten/erhofften Ergebnisse bei einer Minimierung von Problemen, Wiederholmessungen und Geräteausfallzeiten. Zeit- und Lösemittelersparnis wären schon erfreulich, *de facto* sind diese jedoch zweit- oder gar drittrangige Ziele. Die Anforderungen an eine Routinemethode lauten somit in erster Linie Zuverlässigkeit, Robustheit und dann erst Zeit- und Kostenersparnis. Dies alles kann weitgehend ohne UHPLC realisiert werden: So erlaubt die US-Pharmakopöe eine ganze Menge an Anpassungen, ohne dabei die Methode revalidieren zu müssen. Danach könnte ich beispielsweise eine andere „C₁₈“ verwenden oder eine um 70 % kürzere, eine um 25 % dünnere, eine mit um 50 % kleineren Teilchen gefüllte Säule einsetzen. Ferner darf laut USP und ebenso laut europäischer Pharmakopöe der Gradient verändert werden, lediglich End% B muss beibehalten werden (zu Details s. [8–10]). Bleiben nach einer Anpassung die von mir im Vorfeld gut durchdachten(!) und dem Analysenziel dienend festgelegten Systemeignungskriterien bestehen, ist eine Revalidierung nicht notwendig – notfalls reicht eine „Mini-Revalidierung“ aus. Das Thema ist komplex und könnte für sich ein Buch füllen. Wir beenden diesen kleinen Ausflug mit folgender persönlichen Einschätzung: Es ist sicherlich nicht einfach, jedoch könnte man zumindest versuchen, die eigene Ängstlichkeit ein wenig zu überwinden und die von Behörden/Organisationen gegebenen Spielräume zu nutzen. Dabei ließe sich möglicherweise die Robustheit und Schnelligkeit meiner Methode bei Einhaltung der Anforderungen erhöhen. Dabei spare ich für meinen Arbeitgeber Geld, ich schone meine Nerven, ich tue etwas Sinnvolles für die Umwelt (Lösemittelverbrauch) – und die durchgeführten Anpassungen sind formal in Ordnung. Wenn Derartiges in einem stark regulierten Umfeld wie der Pharma unter Umständen möglich ist, könnte dies analog umso mehr auch in anderen Bereichen realisiert werden.

Das Fazit für ein Routinelabor lautet aus meiner Sicht: Nutze zunächst regulatorische Spielräume und die technischen Möglichkeiten deiner aktuellen HPLC-Anlage aus. Bereits dies kann ein wichtiger Schritt sein, welcher zu einer merklichen Verbesserung in deinem Sinne führt. Wenn du möchtest/darfst, kannst du mit einem vertretbaren Aufwand und kleinen Investitionen an deiner HPLC-Anlage „UHPLC-like“-Trennungen erzielen:

- Verdünne die Probenlösung mit Wasser/Puffer, somit wird eine Anreicherung am Säulenkopf möglich, daraus folgt eine Verbesserung der Peakform, insbesondere bei den früh eluierenden Peaks.
- Verwende eine kleinere Schleife für den Probengeber und im Falle eines Hochdruckgradienten einen kleineren Gradientenmischer (s. Kapitel 4).
- Denke an die Einstellparameter (Sample Rate, Time Constant/Response Time, Dwell Time, Bandwidth, Slit, s. Abschnitt 1.4).
- Verwende eine kleinere UV-Zelle für deinen DAD: 2–4 μL Volumen OK, optimal wäre natürlich: 0,25–1,00 μL , Länge: 60–85 mm; bei einigen Anbietern sind solche bereits erhältlich, bald sogar 100 mm).

Wenn anschließend die Methode eine gewisse Zeit zuverlässig funktioniert und du diese weiterhin verbessern möchtest (wollen dies tatsächlich alle Beteiligten?), solltest du selbstverständlich bei entsprechendem Budget jetzt an UHPLC denken.

1.4

Wie kann das Potenzial der UHPLC tatsächlich ausgeschöpft werden?¹⁾

Ein Blick auf die Besonderheiten der UHPLC ist auch zur Beantwortung dieser Frage hilfreich: Es sind kleine Tot- und Verweilvolumina und hohe Drücke möglich. Ferner sollte stets die aktuelle Fragestellung im Vordergrund stehen. Folgendes können wir festhalten: Für nicht allzu schwierige analytische Fragestellungen – insbesondere im Gradientenmodus – sind alle kommerziellen UHPLC-Anlagen gut genug. Je anspruchsvoller das Trennproblem ist, umso wichtiger werden die Einstellparameter und umso eher besteht u. U. Handlungsbedarf bezüglich einer Hardwareoptimierung. Dazu sollen nachfolgende Ausführungen einige Hinweise liefern. Am Beispiel des Totvolumens wird zunächst verdeutlicht, dass je nach aktueller Situation, welche nur individuell beurteilt werden kann, die gesamte Bandbreite denkbar ist: von „kein Handlungsbedarf“ bis „dringender Handlungsbedarf“.

Totvolumen

Fakt ist: Das Totvolumen einer jeden UHPLC-Anlage auf dem Markt ist für eine 50 mm $\times$ 2,1 mm, $\leq 2 \mu\text{m}$ -Säule oder kleiner viel zu groß. Je nach Hersteller beträgt der Verlust an Effizienz ca. 20–40 % und wird von den meisten Herstellern

1) Siehe auch Abschnitt 2.1, Kapitel 3 und 9.

offen eingeräumt. Wenn Sie bei frühen Peaks unter isokratischen Bedingungen ein auffallendes Tailing beobachten, wissen Sie, dass dies aktuell der Fall ist. Wir haben folgendes Experiment durchgeführt:

Der Tailing-Faktor eines Analyten wurde bei vier Temperaturen (30, 40, 50 und 60 °C) und einem konstanten Fluss von 0,7 mL min⁻¹ bestimmt, s. Tab. 1.1.

Tab. 1.1 Zum Einfluss von Totvolumina auf die Peaksymmetrie von früh eluierenden Peaks, Details s. Text.

Fluss (mL min ⁻¹)	Temperatur (°C)	Retentionszeit (min)	Tailing (interner Faktor)
0,7	60	0,57	595
0,7	50	0,64	330
0,7	40	0,73	280
0,7	30	0,85	250

Ergebnis

Eine schnelle Kinetik aufgrund einer Erhöhung der Temperatur von 30 auf 60 °C und der damit verbundenen Erhöhung der Bodenzahl kann die Verschlechterung der Peakform im Falle von sehr früh eluierenden Peaks durch das Totvolumen nicht ausgleichen. Auch bei Verwendung von UHPLC-Geräten sollte man sich genau überlegen, wie „schnell“ schnelle Trennungen im isokratischen Modus sein sollten.

Die Frage lautet nun: Stört es mich, dass durch das Totvolumen die Peakbreite meiner Peaks statt beispielsweise den möglichen 4 jetzt 6 s beträgt und/oder der Peak asymmetrisch eluiert? Oder eigentlich eher nicht, da ich ein relativ einfaches Trennproblem habe und der geforderte Asymmetriefaktor von 1,3 erfreulicherweise nicht überschritten wird? Bei Gradiententrennungen ist das Totvolumen (nicht das Verweilvolumen!) noch weniger relevant, denn dort sind schmale Peaks nahezu „garantiert“. Wenn andererseits dieser Effizienzverlust bei isokratischen Methoden die Trennung meiner früh eluierenden Peaks beeinträchtigt, besteht Handlungsbedarf. Hier helfen Optimierungskits mit besonders dünnen Kapillaren, „totvolumenfreie“ Fittings, speziell designte UV-Zellen etc., die in der Zwischenzeit nahezu alle Hersteller anbieten (Kapitel 9 und 12).

Fazit: Sollen UHPLC-Geräte an den Grenzen der Spezifikationen genutzt werden, muss man ziemlich umdenken, sonst bleibt manches hinter den Erwartungen zurück. Oder aber man ist bereit, bescheidener zu werden. Also: Je nach Situation, entweder „weiter so“ oder eben dringender Handlungsbedarf.

Zahlenwerte für Einstell- und chromatographische Parameter sowie Anforderungen an die Hardware, die für UHPLC-Trennungen notwendig/sinnvoll sind:

- Datenrateaufnahme (Sample Rate): üblicherweise 20–40 Hz; bei Läufen ca. ≤ 1 –2 min und Peakbreite von ca. ≤ 1 –2 s wären schon 80–90 Datenpunkte pro Peak notwendig, möchte man sich keinen Verlust an Auflösung einhandeln.
- Zeitkonstante (Time Constant): ≤ 50 ms; bei einigen Softwareprogrammen ist die Zeitkonstante allerdings an die Datenrateaufnahme gekoppelt.
- Bandbreite (Bandwidth) und Spalt (Slit) beim DAD: für eine gute Nachweisempfindlichkeit 16 nm, für eine gute spektrale Auflösung (z. B. für „Peak Purity“ Tests) 1–4 nm.
- Injektion: Möglichst kurze Injektionszyklen; hier sind Injektoren mit festen Schleifen (Fixed Loop Injectors) von Vorteil, allerdings sollte die Verschleppungsproblematik nicht aus den Augen gelassen werden. Injektionsvolumen: ca. 1–2 μL (bei einer 50 mm $\times$ 2,1 mm-Säule mit einem Säulenvolumen von ca. 200 μL), in jedem Fall < 5 μL . Es gilt wie wir weiter oben gesehen haben die 1 %-Regel: Das Injektionsvolumen darf maximal 1 % des Säulenvolumens betragen, sonst macht sich die Volumenüberladung bemerkbar. Zur Möglichkeit der Injektion von größeren Volumina, s. Kapitel 9.
- Zellvolumen: 1–2 μL , 0,25 μL überlegenswert (zur UHPLC/MS-Kopplung, s. Kapitel 5).
- Tot- und Verweilvolumina; hier herrscht zzt. ein quasi sportlicher Wettbewerb unter den Herstellern, wer zuerst, wie viele Mikroliter einsparen kann.

Merke

10, notfalls auch 15 μL Totvolumen wären für eine Säule mit 100–300 μL Säulenvolumen akzeptabel. Hier gilt die 10 % Regel: Das Volumen außerhalb der Trennsäule darf 10 % des Säulenvolumens nicht überschreiten, sonst bricht die Bodenzahl deutlich ein, zu Details s. Abschnitt 2.1 und Kapitel 3. Bezüglich Verweilvolumina werden zwar bereits Niederdruck-UHPLC-Geräte angeboten, die ein Verweilvolumen von ca. ≤ 100 μL aufweisen, aber auch 150–200 μL sind sicherlich kein „schlechter“ Wert. Denn das Verweilvolumen beeinflusst zwar bekanntlich die Trennung, jedoch ist eine allgemeingültige Aussage, ob ein großes/kleines Verweilvolumen prinzipiell „gut“ oder „schlecht“ für die Trennung ist, nicht möglich.

- Generelles: Bei hohen Drücken und gleichzeitig hohen Flussraten wird durch die Reibungskräfte Wärme erzeugt (Frictional Heating). Dieser Effekt kann die Trennung merklich beeinflussen und sollte stets im Auge behalten werden (s. Abschnitt 2.2). Ferner ist ein Vorheizer mit einem Volumen von 1–3 μL (z. B. ca. 300 mm, 100 μm -Kapillare vor dem Säulenofen) Teil einer jeden modernen UHPLC. UHPLC-Eluenten werden üblicherweise über 0,22 μm -Filter filtriert. Gibt es dennoch Probleme mit verstopften Kapillaren, Fritten und vor allem Säulen, wäre ein zusätzliches Filtrieren der Probenlösungen sowie sonstigen Chemikalien über ein 0,1 μm -Filter sicherlich überlegenswert.

1.5

Zusammenfassung und Ausblick

Vorteile der UHPLC:

- Erhöhte Flexibilität im Vergleich zur HPLC sowie erweiterte Möglichkeiten, um die Selektivität/Auflösung zu verbessern: Methanol als organisches Lösemittel, Temperaturerniedrigung, Flusserhöhung und somit Vergrößerung des Gradientenvolumens – auch beim Einsatz von dünnen/langen Säulen. Mit diesen interessanten Möglichkeiten geht eine Druckerhöhung einher.
- Die Bodenzahl/Peakkapazität kann merklich erhöht werden: Säulenkopplungen mit 2,5–3,5 μm porösem bzw. 1,5–5 μm Fused Core Material.
- Für $\leq 2 \mu\text{m}$ -Material sehr gutes Bodenzahl/Retentionszeit-Verhältnis, somit ausreichend gute Auflösung in kurzer Zeit für nicht allzu anspruchsvolle Trennungen. Dadurch werden eine Erhöhung des Throughputs und eine Abnahme des Lösemittelverbrauchs erreicht. Der Hauptvorteil in der Praxis liegt jedoch weniger im schnellen Analysieren von Sequenzen, welches häufig durch Autosampler auch nachts möglich ist, sondern in der schnellen Kontrolle: Mögliche Probleme der Sequenz werden schnell erkannt und nicht erst morgens, wenn alles zu spät ist und ich – und evtl. auch die Produktion – viel Zeit verloren habe (hat), s. auch Kapitel 11.
- Durch das kleine Totvolumen und in Kombination mit dünnen Säulen und kleinen Teilchen ergibt sich ein kleines Peakvolumen und dadurch eine Verbesserung der Massensensitivität.

Als Nachteile können genannt werden:

- Größerer Aufwand bei der Probenvorbereitung; ferner stellen matrixbelastete Proben und starke Probenlösemittel echte Herausforderungen dar: Die kleinen Teilchen können vor allem im letztgenannten Fall die Verschlechterung der Peakform nicht kompensieren.
- Nicht immer zufriedenstellende Reproduzierbarkeit bei wechselnden Bedingungen.
- Ab ca. 800 bar merkliche Reibungswärme, ab ca. 600–700 bar Selektivitätsänderung möglich; die beiden genannten Punkte sind ein Grund dafür, dass man eine Methode, wie oft dargestellt wird, nicht so einfach von HPLC nach UHPLC und umgekehrt übertragen kann.
- Schwierigkeiten beim Methodentransfer; wegen der kleinen Säulenvolumina bereiten kleine Unterschiede in den Verweilvolumina bei Gradientenanlagen wesentlich mehr Probleme als in der HPLC.
- Rundum: Es ist erhöhte Sorgfalt beim gesamten Handling notwendig.

Wie bei nahezu jeder Technik erweisen sich typische Charakteristika einer Technik je nachdem sowohl als Vor- wie auch als Nachteile. Beenden wir diese Diskussion mit einem Beispiel, welches dies untermauert. Betrachten wir hierzu das in der UHPLC typisch kleine Säulenvolumen: Durch die geringen Säulen- und Dispersionsvolumina ergibt sich in der UHPLC ein geringes Peakvolumen. Ein

solches ist der Grund für die exzellente Massensensitivität in der UHPLC. Aber das geringe Säulenvolumen ist gleichzeitig auch die Ursache für das starke Fronting im Falle eines starken Probenlösemittels. Ferner ist dieses vor allem bei den früh eluierenden Peaks auch der Anlass für das Tailing, da das Totvolumen der marktüblichen UHPLC-Geräte für kleine Säulenvolumina im isokratischen Modus noch immer viel zu groß ist. Und schließlich bringt das geringe Säulenvolumen mit sich, dass man das Injektionsvolumen nicht erhöhen kann und dies führt zu der schlechten Nachweisempfindlichkeit der UHPLC.

Nachfolgend wird versucht, die Möglichkeiten der UHPLC in der Praxis für einige typische, vereinfacht dargestellte Situationen zu skizzieren:

1. *Bestehende HPLC-Methode, Sie dürfen nur kleine Änderungen vornehmen.* Sie können die Methode mit Ihrer klassischen HPLC-Säule ohne Bedenken an der UHPLC-Anlage fahren, lediglich das Injektionsvolumen und auch der Gradient müssen angepasst werden. Voraussetzung ist natürlich, dass durch die Miniaturisierung keine Verstopfung wegen der dünnen Kapillaren etc. erfolgt, (Näheres s. weiter oben). Ergebnis: Durch das kleinere Totvolumen ergeben sich nun schmale Peaks und vermutlich dadurch eine bessere Auflösung bei einem höheren Druck.
2. *Bestehende HPLC-Methode, Sie dürfen Säulenlänge, Innendurchmesser und Teilchengröße variieren und den Fluss entsprechend anpassen.* Sie verwenden bei gleicher stationärer Phase eine um Faktor 2 kürzere Säule mit ebenso um Faktor 2 kleineren Teilchen. Ergebnis: „gleiche“ Trennung in der Hälfte der Zeit bei einem um Faktor 2 höheren Druck und einer ebenso um Faktor 2 niedrigeren Nachweisgrenze. Interessanter Nebeneffekt: ein um Faktor 2 geringerer Lösemittelverbrauch. Setzen Sie dagegen statt einer 4 mm- nun eine 3 mm-Säule ein (dies entspricht einer Abnahme um 25 %, also gemäß USP und EP erlaubt, da dies eine „Anpassung“ und keine „Änderung“ wäre), ergibt sich ein um ca. 45 % (!) geringerer Lösemittelverbrauch bei einem um den gleichen Prozentsatz erhöhten Druck.
3. *Die Methode soll in puncto Auflösung optimiert werden, Sie genießen jegliche Freiheiten.* Wie weiter oben erläutert, können Sie mit Methanol als organischem Lösemittel, bei niedrigen Temperaturen sowie mit langen Säulen/Säulenkopplungen experimentieren. Ergebnis: Dies kann bei erhöhtem Druck zu einer Verbesserung der Selektivität (erste zwei Maßnahmen) bzw. Erhöhung der Bodenzahl/Peakkapazität (längere Säule/Säulenkopplungen) führen.
4. *Die Methode ist so weit in Ordnung, in puncto Auflösung könnte sie jedoch ruhig ein wenig besser werden.* Sie haben eventuell wenig Zeit, um über die mobile Phase, den pH-Wert, andere stationäre Phasen, Modifier etc. die Selektivität zu verbessern und wenden sich daher der zweitbesten Möglichkeit, der Bodenzahl, zu. Sie verwenden lediglich eine Säule mit halb so großen Teilchen. Ergebnis: Es kommt bei einem um Faktor 4 höheren Druck zu einer Erhöhung der Bodenzahl um Faktor 2 und somit einer Verbesserung der Auflösung um Faktor 1,4. Dies könnte möglicherweise ausreichend sein, es ergibt sich dar-

über hinaus ein interessanter Nebeneffekt: Die Nachweisgrenze wird ebenfalls um den Faktor 1,4 erniedrigt.

5. *Die Methode soll in puncto Auflösung optimiert werden. Sie haben wie eben angenommen, auch jetzt wenig Zeit, um die chromatographischen Bedingungen zu variieren.* Sie verwenden eine um Faktor 2 längere Säule mit ebenso um Faktor 2 kleineren Teilchen. Ergebnis: Bei einer um Faktor 2 längeren Retentionszeit ergibt sich eine ebenso um Faktor 2 bessere Auflösung. Das Problem lautet hier: ein um Faktor 8 höherer Druck. Sollte der ursprüngliche Druck z. B. bei ca. 150 bar gelegen haben, ergäbe sich nun ein Druck von ca. 1200 bar, den eine moderne UHPLC-Anlage auch in der Routine bewältigen sollte – oder aber Sie denken an Fused Core-Materialien.
6. *Die Nachweisgrenze der Methode soll verbessert werden, genauer: die Massenempfindlichkeit, nicht die Nachweisempfindlichkeit.* Das heißt Sie können/dürfen das Injektionsvolumen nicht erhöhen. Sie verwenden eine Säule mit einem kleineren Innendurchmesser und kleineren Teilchen – evtl. verringern Sie auch die Säulenlänge. Ergebnis: Die relative Massenempfindlichkeit kann je nach Maßnahme um einen Faktor zwischen 5–20 verbessert werden.

■ **Bemerkung**

Die soeben in der Beschreibung der Beispielsituationen angegebenen Zahlen beziehen sich auf isokratische Trennungen. So ergeben sich beispielsweise bei Gradiententrennungen je nach Gradientenverlauf andere Drücke und die Retentionszeiten in den Fällen 2 und 5 ändern sich nicht um Faktor 2, sondern abhängig von gradientenspezifischen Parametern nur um ca. 10–30 % [11].

Ausblick

Moderne UHPLC-Anlagen weisen in etwa folgende Spezifikationen aus: ca. 80–100 μL Verweilvolumen bei Niederdruck- bzw. 35–50 μL bei Hochdruckgradienten, $\leq 3\text{--}5\text{ }\mu\text{L}$ Totvolumen, ca. 1500 bar Rückdruck, Fluss bis 5 mL min^{-1} möglich. Was kann in der Zukunft erwartet werden? Der Druck auf die Hersteller, mit immer neuen Produkten auf den Markt zu kommen, wird vermutlich dazu führen, dass die UHPLC-Hardware weiterentwickelt wird. Es ist gut möglich, dass bei der nächsten UHPLC-Generation die Tot- und Verweilvolumina weiter minimiert werden. Der Schwerpunkt liegt hier eindeutig beim Verweilvolumen als solches und bei der Geometrie der Gradientenmischkammer im Besonderen, denn die Mischungsqualität sollte durch die Miniaturisierung nicht leiden. Der zweite kritische Punkt ist sicherlich der Probengeber: schnelle Injektionszyklen und Vermeidung/Minimierung von Verschleppungen. So bleiben die 1–2 μL Injektionslösung bis zur Injektion an der Spitze der (keramischen) Nadel, die Schleife wird nicht für den Injektionsvorgang verwendet und dient lediglich als „Puffer“, um sich eine Flexibilität bezüglich des Verweilvolumens bei unterschiedlichen Anlagen im Falle von Methodentransfer zu gewähren. Schließlich widmet man sich der Problematik der enormen Druckstöße, die die Säule bei jeder Injektion zu erleiden hat. Zu deren Minimierung stellt eine weitere Herausforderung bezüg-

lich des Probengeberdesigns dar. Ferner sollten u. U. Drücke von ca. 2000 bar auch bei Flüssen von $1\text{--}3\text{ mL min}^{-1}$ technisch zu realisieren sein. Die Herausforderung liegt hier weniger auf der Seite des zu erzielenden Drucks, vielmehr geht es um die Ermüdung der Materialien bei hohen Drücken (s. Kapitel 7). Was wäre an einem derartig designten Gerät chromatographisch möglich? An einer zukünftigen UHPLC-Anlage könnten $10\text{--}20\text{ mm} \times 2,1\text{-Säulen}$, gefüllt mit $1\text{--}1,1\text{ }\mu\text{m}$ porösem bzw. $0,7\text{--}0,8\text{ }\mu\text{m}$ Fused Core Material, eingesetzt werden. Mithilfe der theoretisch resultierenden $20\,000\text{--}25\,000$ Böden wären auch anspruchsvolle Trennungen innerhalb von wenigen Sekunden möglich – vorausgesetzt die drei modernen Detektoren, DAD, Corona und MS/Ionenmobilisation, können die Signale ohne Informationsverlust verarbeiten (s. auch Kapitel 5 und 6). Diese Säulenoptionen werden mutmaßlich aufgrund folgender limitierenden Faktoren nicht realisiert: Eine breite Korngrößenverteilung bei den kleinen Teilchen und eine $10\text{--}20\text{ mm}$ -Säule mit $0,7\text{--}1,0\text{ }\mu\text{m}$ -Material wären nur unter erheblichem Aufwand effizient und reproduzierbar zu packen, von der Inhomogenität der Packung an der Säulenwand und der erhöhten Löslichkeit von kleinen Teilchen ganz zu schweigen. Weitere Schwierigkeiten wären das für eine derartige Säule voraussichtlich beträchtliche vorhandene Totvolumen von $2\text{--}3\text{ }\mu\text{L}$ und die enorme Reibungswärme, welche dann entstünde. Auch der zukünftige Anwender wird voraussichtlich bereit sein, „lange“ Läufe von ein paar Minuten, aber unter robusten Bedingungen, in Kauf zu nehmen. Das wahrscheinlichere Szenario für die UHPLC auch in der Zukunft: Statt mit extrem kurzen Säulen und extrem kleinen Teilchen extrem kurze Retentionszeiten anzustreben, wird ihre Stärke eher für den Einsatz von langen bzw. gekoppelten Säulen mit ca. $1,3\text{--}3\text{ }\mu\text{m}$ -Material genutzt, die stetige Verbesserung der Peakkapazität dürfte im Vordergrund stehen. Neben technologischer Weiterentwicklung wenden sich die Hersteller verstärkt der Robustheit und Zuverlässigkeit der Geräte zu, um möglichst große Kundenkreise für die UHPLC zu gewinnen. Bezüglich der Matrix der stationären Phase haben poröse und Fused Core Materialien beide ihre Vorteile und Schwächen. Vermutlich wird es weiterhin – ähnlich der HPLC/UHPLC – eine Koexistenz geben.

Literatur

- 1 Snyder, L.R., Kirkland J.J. und Dolan, J.W. (2009) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons.
- 2 Meyer, V.R. (2009) *Praxis der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie*, Wiley-VCH Verlag.
- 3 Snyder, L.R. und Dolan, J.W. (2007) *High-Performance Gradient Elution*, John Wiley & Sons.
- 4 Kromidas, S. (Hrsg.) (2006) *HPLC richtig optimiert*, Wiley-VCH Verlag.
- 5 Zuo, Y. (2014) *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*, Nova Science.
- 6 Steiner, F. et al. (2014) Optimierungsstrategien in der RP-HPLC, in *Der HPLC-Experte – Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC* (Hrsg. S. Kromidas), Wiley-VCH Verlag, S. 101.
- 7 Kromidas, S. und Kuss, H.-J. (Hrsg.) (2008) *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*, Wiley-VCH Verlag.

- 8 USP 34 Physical Tests (621) Chromatography.
- 9 *Europäische Pharmakopöe*, Kapitel 2.2.46 Chromatographische Trennmethode.
- 10 Kursunterlagen NOVIA GmbH, HPLC in der Pharma, Frankfurt/Main.
- 11 Kromidas, S. *et al.* (2014) Aspekte der Gradienten-Optimierung, in *Der HPLC-Experte – Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC*, (Hrsg. S. Kromidas), Wiley-VCH Verlag, S. 183