

## (U)HPLC Methodenparameter Kurzübersicht

Bei der Wahl einer (U)HPLC Säule für eine neue Applikation ist der wichtigste Faktor für eine hohe Auflösung die Selektivität. Diese bestimmende Eigenschaft ist zum Großteil von den zu analysierenden Analyten abhängig, kann aber zum Beispiel durch die Wahl der stationären Phase, organischer Lösungsmittel und von Additiven der mobilen Phase verändert werden.

Allerdings gibt es neben der Selektivität noch andere wichtige Parameter wie:

- **Innendurchmesser oder Radius der Säule (ID, r)**
- **Säulenlänge (L)**
- **Partikeldurchmesser der stationären Phase (d<sub>p</sub>)**
- **Flussrate der mobilen Phase (F)**
- **Injektionsvolumen (V<sub>i</sub>)**
- **Porosität der Filter für Probe und Eluenten**

Diese sind voneinander abhängig und müssen ebenfalls betrachtet werden, um ein optimales Trennergebnis zu erreichen. Besonders beim Methodentransfer zwischen verschiedenen Geräten oder Detektionsmethoden ist es unausweichlich, diese Parameter zu beurteilen und anzupassen.

Dieser Expertentipp dient als Kurzübersicht für die häufigsten Kombinationen von Säulendimensionen und dazu passenden Methodenparametern, um Anwender in der Flüssigchromatographie beim Methodentransfer, Skalieren und Optimieren von Methoden, sowie bei der Fehlersuche zu unterstützen.

### Anpassen der Flussrate an verschiedene Säulendurchmesser und Partikelgrößen der stationären Phase

Die optimale Flussrate in isokratischen Methoden wird üblicherweise durch die van Deemter Gleichung beschrieben. Sie beschreibt die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase (u) in cm\*s<sup>-1</sup>, bei der verschiedene kinetische und Flussparameter in einem Minimum der theoretischen Trennstufenhöhe (H) und damit in der besten Trenneffizienz resultieren.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m) * u$$

Die Terme A (Eddy-Diffusion), B (Longitudinal-Diffusion) und C (Resistenz gegen Massentransfer; s = in der stationären Phase, m = in der mobilen Phase) können in mehrere Parameter und Konstanten erweitert werden. Im Rahmen dieser Kurzübersicht sind die wichtigen Zusammenhänge, dass eine Vergrößerung des Partikeldurchmessers in einem linearen Anstieg von A, aber einem exponentiellen Anstieg von C<sub>s</sub> resultiert.

#### Beispiel:

Beim Hochskalieren einer Applikation von einer Säule mit den Dimensionen 250mm x 4,6mm auf eine Säule mit den Dimensionen 250mm x 10mm muss die Flussrate um einen Faktor von 4,7 erhöht werden.

$$SF = \left( \frac{5.0 \text{ mm}}{2.3 \text{ mm}} \right)^2 = 4.7$$

Mit einer initialen Flussrate von 1 mL\*min<sup>-1</sup> ist die resultierende Flussrate **4,7 mL\*min<sup>-1</sup>**.

**Das bedeutet, dass die optimale Flussrate bei Verwendung größerer Partikel abnimmt und bei Verwendung kleinerer Partikel zunimmt.**

Um die lineare Geschwindigkeit der mobilen Phase und damit die Retentionszeit und die Trenneffizienz konstant zu halten, wenn der Säuleninnenradius (r) verändert wird, muss die Flussrate (F) in mL\*min<sup>-1</sup> mit Hilfe eines Skalierungsfaktors (SF) angepasst werden:

$$F_2 = F_1 * SF$$

Hierbei ist SF lediglich vom inneren Radius beider Säulen abhängig:

$$SF = \left( \frac{r_2}{r_1} \right)^2$$

**Da Diffusionseffekte eine größere Rolle bei SEC- und HILIC-Trennungen spielen, ist die optimale Flussrate in diesen Trennmodi für gewöhnlich bis zu 50 % niedriger im Vergleich zu RP Anwendungen.**

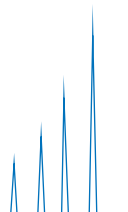


Tabelle 1: Typische Flussraten für mobile Phasen in der RP (Acetonitril/Wasser) in Abhängigkeit vom Säulennendurchmesser und Partikelgröße der stationären Phase.

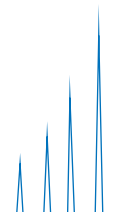
IDs [mm]	Typische Flussraten in RP nach Partikelgröße			
	1,9 µm	3 µm	5 µm	10 µm
0,075	0,3 µL/min	0,15 µL/min	0,1 µL/min	–
0,1	0,6 µL/min	0,45 µL/min	0,3 µL/min	–
0,3	9 µL/min	4,5 µL/min	3 µL/min	–
0,5	30 µL/min	15 µL/min	10 µL/min	–
1,0	150 µL/min	75 µL/min	50 µL/min	–
2,1/2,0	0,6 mL/min	0,3 mL/min	0,21 mL/min	–
3,0	1,2 mL/min	0,6 mL/min	0,43 mL/min	–
4,0	–	1,0 mL/min	0,7 mL/min	–
4,6	–	1,5 mL/min	1,0 mL/min	0,7 mL/min
10	–	–	4,7 mL/min	7,7 mL/min
20	–	–	21 mL/min	18 mL/min
30	–	–	42 mL/min	38 mL/min

Dadurch, dass die optimale Flussrate steigt, wenn die Partikelgröße der stationären Phase reduziert wird, und beide Faktoren zu einem höheren Rückdruck führen, ist ein Anpassen der Säulenlänge meist nötig. So wird der Systemdruck unter dem Maximum für die Säulenhardware,

der stationären Phase und dem des Systems gehalten. Aus diesem Grund haben sich einige Standard-Dimensionen für Säulen etabliert, die von der verwendeten Partikelgröße und/oder dem LC-Equipment abhängen.

Tabelle 2: Typische Säulendimensionen in Abhängigkeit der Partikelgröße der stationären Phase.

	Partikelgröße der stationären Phase			
	1.9 µm	3 µm	5 µm	10 µm
<b>Säulenlänge [mm]</b>	≤ 100	≤ 150	≤ 250	≤ 250
<b>IDs [mm]</b>	≤ 3,0	≤ 4,6	≤ 10	≤ 30
<b>Typisches Beispiel</b>	<b>100 x 2,1 mm</b>	<b>150 x 3,0 mm</b>	<b>250 x 4,6 mm</b>	<b>250 x 20 mm</b>



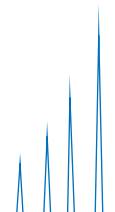
## Anpassen des Probeninjektionsvolumens auf das Säulenvolumen und Stärke des Probenlösungsmittels

Um scharfe und symmetrische Peaks in einer HPLC-Analyse zu erhalten, müssen die Probenbestandteile stark am Säulenkopf zurückgehalten werden. Wenn die Probe in einem schwachen Lösungsmittel vorliegt oder das Injektionsvolumen gering ist, ist die resultierende Bande adsorbierter Substanzen schmal und die Peakeffizienz damit hoch. Ist das Lösungsmittel allerdings stark oder das Volumen zu groß, wird die Bande verbreitert und die Effizienz sinkt. Folglich ist das maximale Injektionsvolumen ( $V_i$ ) stark abhängig von den spezifischen Analyten und

den verwendeten Lösungsmitteln. Das Injektionsvolumen sollte immer abhängig von der Signalintensität bei einem Minimum gehalten werden, sollte 3 % des Säulenvolumens ( $V_c$ ) bei Verwendung schwacher Lösungsmittel und 0,1 % bei Verwendung starker Lösungsmittel nicht überschreiten. **Als generelle Richtlinie für Injektionen in schwachem Lösungsmittel wird empfohlen, ein Injektionsvolumen von etwa 1 % des verwendeten Säulenvolumens zu wählen.**

Tabelle 3: Empfohlenes Injektionsvolumen für schwache Lösungsmittel in Abhängigkeit von ID und Länge der Säule.

IDs [mm]	Empfohlenes Injektionsvolumen nach Säulenlänge						
	30 mm	50 mm	75 mm	100 mm	125 mm	150 mm	250 mm
0,075	1 nL	2 nL	3 nL	4 nL	5 nL	6 nL	–
0,1	2 nL	4 nL	6 nL	8 nL	10 nL	12 nL	–
0,3	20 nL	35 nL	50 nL	70 nL	85 nL	100 nL	–
0,5	60 nL	100 nL	150 nL	200 nL	250 nL	300 nL	–
1,0	240 nL	400 nL	600 nL	800 nL	1000 nL	1200 nL	–
2,1/2,0	1 µL	2 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL	–
3,0	–	3 µL	5 µL	7 µL	9 µL	11 µL	18 µL
4,0	–	6 µL	9 µL	13 µL	16 µL	19 µL	30 µL
4,6	–	8 µL	13 µL	17 µL	20 µL	25 µL	40 µL
10	–	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	120 µL	200 µL
20	–	150 µL	225 µL	300 µL	400 µL	500 µL	750 µL
30	–	350 µL	550 µL	700 µL	900 µL	1000 µL	1750 µL



## Erhalten und Verlängern der Säulenlebensdauer

Das Arbeiten am oder nahe des Drucklimits einer HPLC Säule reduziert deren Lebensdauer aufgrund von mechanischem Stress. Da das Anpassen der Flussrate, der Säulenlänge, des Innendurchmessers der Säule und der Partikelgröße der stationären Phase eine Änderung im erhaltenen Rückdruck mit sich führt, muss dies auch bei der Optimierung dieser Parameter beachtet werden. In manchen Fällen ist es daher vorteilhaft für die Säulenlebensdauer, wenn leicht

unter dem Flussraten-Optimum gearbeitet und dafür das Drucklimit nicht erreicht wird.

Außerdem wird bei Verwendung von Partikelgrößen von 3 µm und weniger der berechnete Partikelzwischenraum für dichteste Kugelpackungen kleiner als die Porosität der Fritten von HPLC Säulen (0,5–2 mm), Filtern für mobile Phasen und einigen Spritzenfiltern für Proben:

Tabelle 4: Partikelgröße der stationären Phase und korrespondierende berechnete Partikelzwischenräume, sowie empfohlene Porosität von verwendeten Probenfiltern.

Partikelgröße [µm]	Partikelzwischenraum [µm]	Empfohlene Filterporosität [µm]
10	1,45	0,45
5	0,72	
3	0,43	0,2
1,9	0,28	

Als Folge werden partikuläre Kontaminationen, die kleiner als die Einlassfritten-Porosität aber größer als der Partikelzwischenraum sind, von der stationären Phase selbst aufgefangen und ein erhöhter Rückdruck durch Säulenverschmutzung resultiert.

Aus diesem Grund sollten alle Filter für mobile Phasen und Proben eine Porengröße von höchstens 0,2 µm bei Verwendung von kleinen Partikeln aufweisen und Schutzsäulen (Guards) mit dem gleichen Material gepackt sein, das auch als stationäre Phase verwendet wird.

