

Systemoptimierung

Core-Shell Trennleistungen auf konventionellen HPLC Systemen

Um das Leistungspotenzial von Core-Shell Säulen auf konventionellen HPLC Systemen auszuschöpfen, kann es hilfreich sein, einige einfache Schritte zur Systemoptimierung durchzuführen. Die Optimierung des Systems hilft, die Bandenverbreiterung durch das Totvolumen des Systems zu reduzieren. In diesem Artikel werden einige einfache Maßnahmen beschrieben, die an einem Standard HPLC System durchgeführt wurden, um eine mit der UHPLC vergleichbare Trennleistung mit sub-3 µm Core-Shell Materialien zu erzielen.

Einführung

Der dominierende Trend bei der Erforschung neuer Partikeltechnologien für die Flüssigchromatographie ist die Entwicklung von Trennmedien mit höherer Effizienz. Core-Shell Partikel sind eine elegante Lösung, weil sie die Trennleistung der Säulen verbessern, ohne extreme hohe Gegendrücke zu erzeugen. Sie bestehen aus einem unporösen Kern, der von einer Schale aus vollporösem Kieselgel umgeben ist (Abb. 1) und sich somit morphologisch von konventionellen vollporösen Kieselgelmateriale unterscheidet. Eine komplette Zusammenfassung der Ergebnisse einiger Publikationen würde den Rahmen dieses Artikels sprengen, allerdings wurde von mehreren unabhängigen Stellen berichtet, dass Core-Shell Partikel die gleichen oder sogar bessere Trenneffizienzen als vollporöse sub-2 µm Materialien liefern können [1–3]. Der Gegendruck, der von HPLC/UHPLC erzeugt wird, ist umgekehrt proportional zur Partikelgröße des in die Säule gepackten Materials. Daher sind Säulen, die mit sub-3 µm Core-Shell Partikeln gepackt sind, in der Lage, Trenneffizienzen von mit vollporösem sub-2 µm Material gepackten Säulen bei deutlich niedrigeren Gegendrücken zu erzielen. Das ermöglicht es Anwendern, Trennleistungen zu erzielen, die an die von sub-2 µm Materialien heranreichen, ohne ein spezielles UHPLC System zu benötigen. Trotz des Potenzials der Core-Shell Partikel, UHPLC-artige Leistungen auf konventionellen HPLC-Systemen zu liefern, hängt es vom jeweiligen System des einzelnen Anwenders ab, inwieweit er dieses Potenzial realisieren kann. In diesem Artikel präsentieren wir Daten, die zeigen, wie sich die

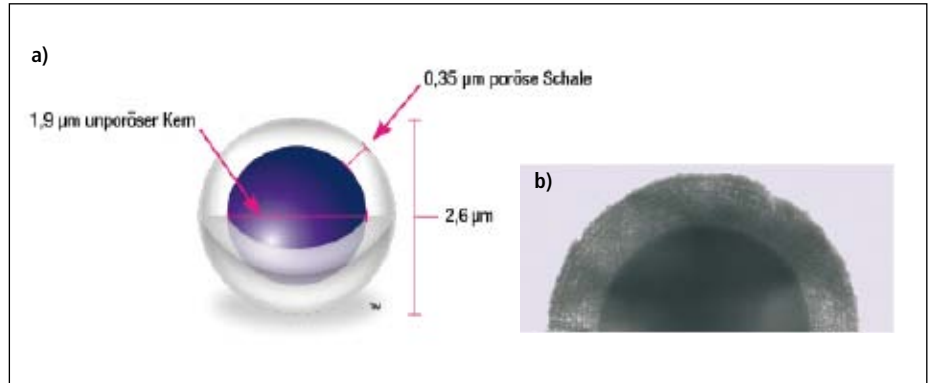


Abb. 1: Schematische Zeichnung eines Kinetex 2,6 µm Core-Shell Partikels (a) und TEM Aufnahme eines Querschnittes des Partikels (b).

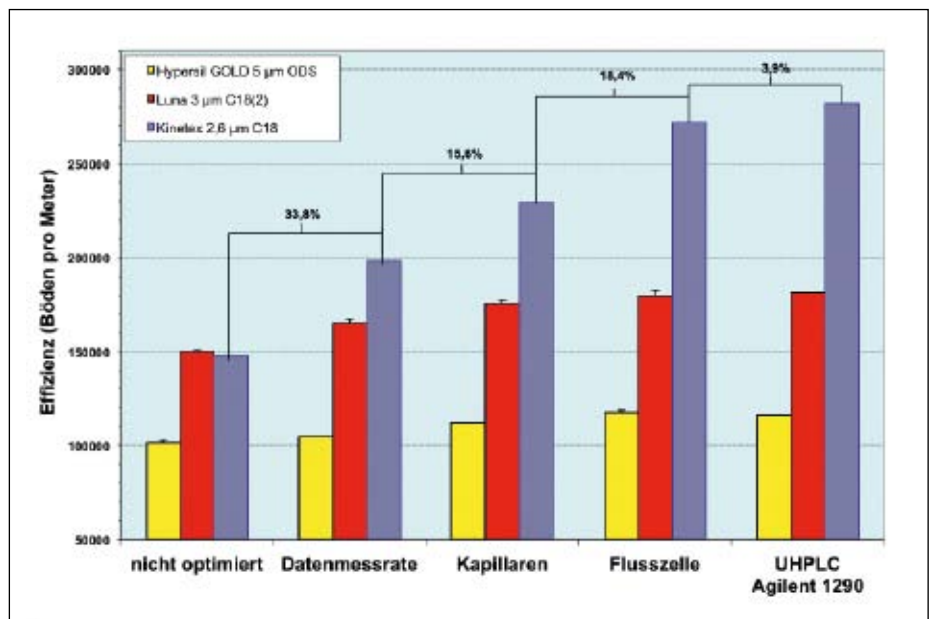


Abb. 2. Einfluss jedes Optimierungsschrittes auf die Säuleneffizienz für die mit vollporösen 5 µm und 3 µm gepackten Säulen sowie die sub-3 µm Core-Shell Säule. Beschreibung siehe Text.

Trennleistung einer mit sub-3 µm Core-Shell Partikeln gepackten Säule auf einem konventionellen System verhält. Zuerst wurde die Säule auf einem nicht optimierten System betrieben. Dann wurde das System mit einem kommerziell erhältlichen Optimierungskit verbessert und erneut getestet. Das so erzielte Ergebnis wurde mit der Trennleistung derselben Säule auf einem UHPLC System verglichen.

Materialien und Methoden

HPLC System

Die nicht optimierte Anfangskonfiguration eines HPLC Systems (Agilent 1100 HPLC) bestand aus

einer binären HPLC Pumpe (Model G1312A), einem Probengeber (Model G1329A) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (Model G1314A). Zur Verbindung der einzelnen Komponenten und der HPLC Säule wurden 0,010 Zoll ID (0,124 mm) PEEK-Kapillaren verwendet. Der Detektor war mit einer Standardflusszelle mit 14 µl Volumen ausgerüstet und die anfängliche Messrate auf 1 s eingestellt.

UHPLC System

Das für diese Untersuchung eingesetzte UHPLC System (Agilent 1290 Infinity UHPLC) bestand aus einer binären Infinity Pumpe (Model G4220A), In-

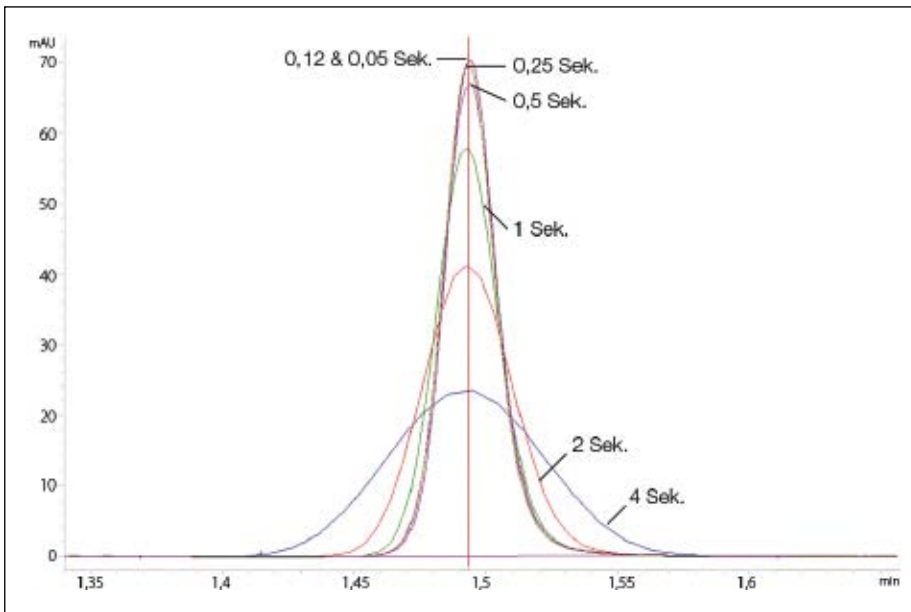


Abb. 3. Einfluss der Erhöhung der Messrate des Detektors auf die Peakform des Naphthalin-Peaks. Die Chromatogramme wurde mit einer Kinetex 2,6 µm Core-Shell Säule auf einem Agilent 1100 System mit Mikroflusszelle erzeugt.

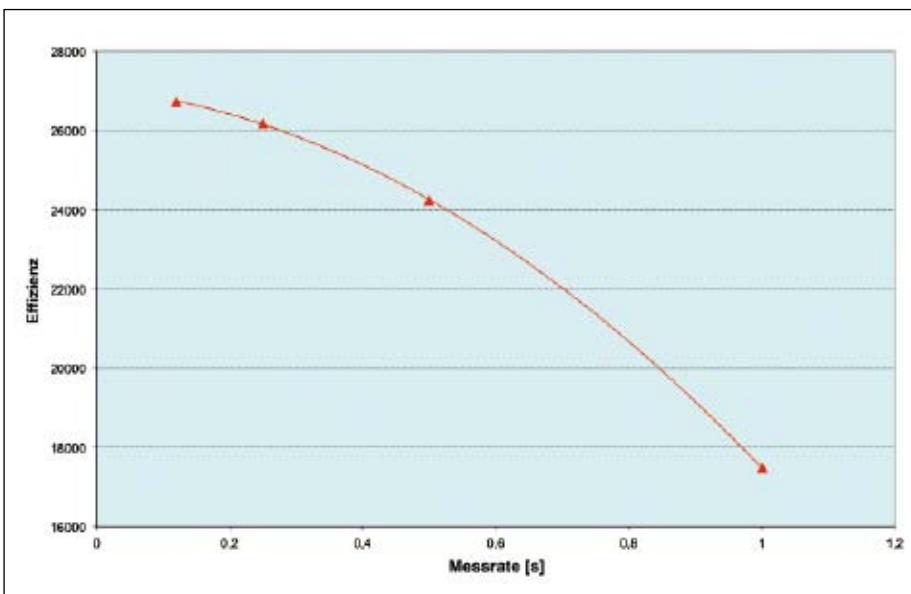


Abb. 4: Einfluss der Messrate des Detektors auf die Effizienz der Säule. Die Werte für die Effizienz wurden anhand der Chromatogramme, die mit der Kinetex 2,6 µm Core-Shell Säule auf einem Agilent 1100 System mit Mikroflusszelle gemessen wurden.

finity Probengeber (Model G4226A) und Infinity VWD SL+ Detektor (Model G1314E). Es wurden Peeksil (0,100 mm ID) Kapillarverbindungen verwendet, um die Säulen mit dem System zu verbinden. Die Länge dieser Verbindungen wurde so kurz wie möglich gehalten. Als Flusszelle wurde eine Zelle mit 2 µl Volumen eingesetzt.

Bestimmung der Säuleneffizienz

Zur Ermittlung der Säuleneffizienz wurden drei wiederholte Injektionen einer Standardmischung bestehend aus Uracil (Totzeitmarker), Acetophenon, Toluol und Naphthalin durchgeführt. Bei den berichteten Retentionszeiten handelt es sich um

Durchschnittswerte (± 1 SD in den Tabellen aufgeführt) der Effizienz für den Naphthalinpeak, die mit der Agilent Chemstation Software (Version Rev. B. 03.01 (317)) berechnet wurden.

Die mobile Phase bestand aus einer vorge-mischten Mischung aus Acetonitril und Wasser (65/35 v/v). Der Test wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Bestandteile der mobilen Phase waren von HPLC-Qualität.

Die Optimierung der HPLC Systemkomponenten wurde mit einem Core-Shell-Optimierungskit (Core-Shell Optimization Kit, Phenomenex) durchgeführt. Bei den beiden für den Vergleich verwendeten vollporösen Säulen handelte es sich um eine Hypersil Gold 5 µm C18 100 x 4,6 mm Säule

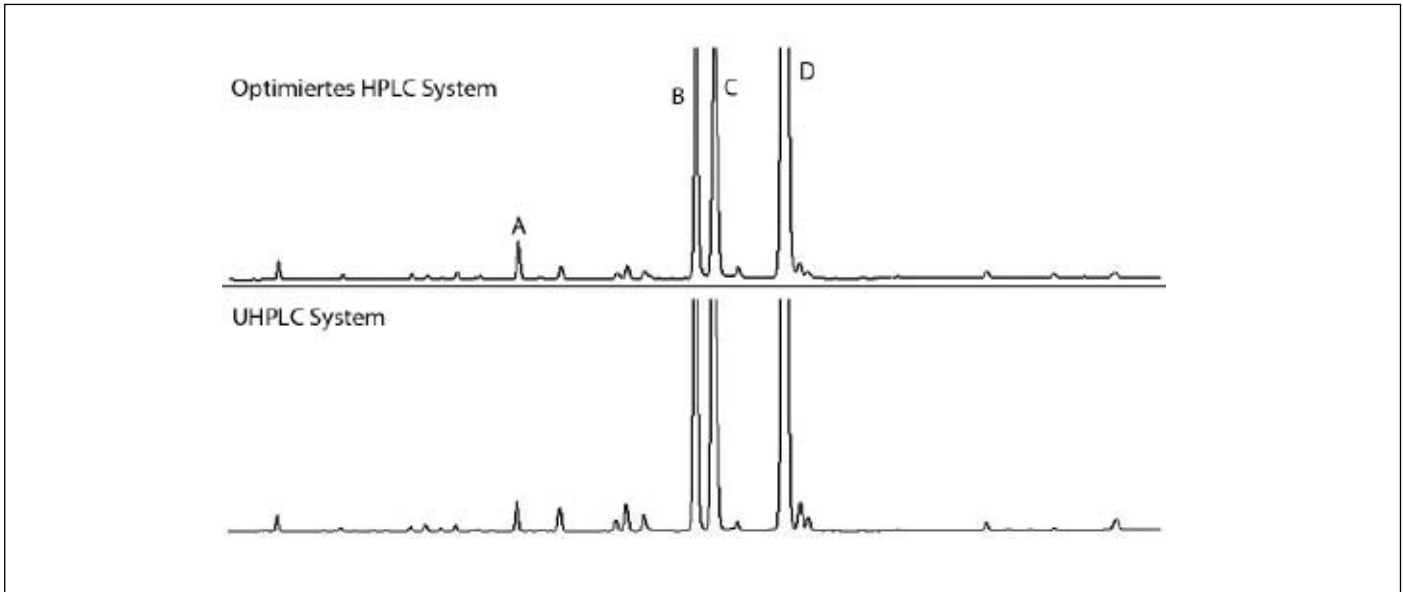


Abb. 5: Abbauprofil eines pharmazeutischen Wirkstoffs gemessen mit einer Kinetex 2,6 µm Core-Shell Säule auf einem HPLC System (oben) und UHPLC System (unten). Bitte beachten Sie, dass die Retentionszeiten sich auf den beiden Systemen um ca. 30 sec unterscheiden, was vermutlich an Unterschieden beim Mischen des Gradienten liegt. Daher wurden die Chromatogramme am Hauptsignal des Wirkstoffs (D) ausgerichtet. Die Methode baute auf einem linearen Gradienten aus Laufmittel A = Wasser mit 0,1 % Perchlorsäure und Laufmittel B = Acetonitril. Der Gradient lief von 10 % B auf 70 % B über 30 Minuten. Für beide Analysen wurde dieselbe Säule (Kinetex 2,6 µm C18 100 x 4,6 mm) verwendet.

(Thermo Scientific) und eine Luna 3 µm C18(2) 100 x 4,6 mm (Phenomenex).

Bei der Core-Shell Säule handelte es sich um eine Kinetex 2,6 µm C18 100 x 4,6 mm Säule (Phenomenex). Alle Säulen wurden bei einer Flussrate betrieben, die möglichst nahe am jeweils optimalen linearen Fluss lag (1 ml/min für Hypersil GOLD 5 µm, 1,5 ml/min für Luna 3 µm C18(2) und 1,8 ml/min für Kinetex 2,6 µm C18).

Ergebnisse und Diskussion

Ausgangsleistung

Auf dem nicht optimierten HPLC System lieferte die Kinetex 2,6 µm C18 Säule eine Bodenzahl von 148.097 Böden pro Meter (Abb. 2), die mit vollporösen 3 µm Partikeln gepackte Säule lieferte 150.387 Böden pro Meter und die mit vollporösen 5 µm Partikeln gepackte Säule 101.406 Böden pro Meter. Hier war somit die Trenneffizienz des sub-3 µm Core-Shell Materials nahezu identisch (1,5% Unterschied) mit dem des vollporösen 3 µm Materials und war 46% größer als die des vollporösen 5 µm Materials.

Schritt 1 von 3

Einfluss der Erhöhung der Detektormessrate

Die erste einfache Optimierung bestand in einer schrittweisen Erhöhung der Messrate von 1 s auf die maximale Rate von < 0,005 s. Anhand der überlagerten Chromatogramme (Abb. 3) für den Naphthalin-Peak wird deutlich, dass die Messrate einen großen Einfluss auf das Chromatogramm hat. Mit steigender Messrate wird der Peak schmaler und höher. Diese Veränderung der Peakform wird auch in der gemessenen er-

Tab. 1. Leistungssteigerung (Effizienz in Böden pro Meter) durch Systemoptimierung

	Nicht optimiertes System	Datenmessrate	Kapillaren	Mikroflusszelle	Gesamtsteigerung	UHPLC Agilent 1290
Hypersil Gold 5 µm ODS	101.407	104.633	111.947	117.377	16%	116.367
Luna 3 µm C18(2)	150.387	164.943	175.553	179.693	19%	181.347
Kinetex 2.6 µm C18	148.097	198.193	229.207	271.463	83%	282.080

höhten Trenneffizienz für die Säule bei steigender Messrate (Abb. 4) reflektiert. Die Effizienz der Core-Shell Säule wurde durch Einstellung der Messrate auf den Maximalwert um 33,8% erhöht. Man muss jedoch beachten, dass durch eine extrem hohe Messrate auch das Grundlinienrauschen erhöht werden kann.

Schritt 2 von 3

Einfluss der Veränderung des Innendurchmessers der Verbindungskapillaren

Im nächsten Schritt ersetzte man die 0,010 Zoll ID Kapillaren durch vorgeschchnittene 0,005 Zoll Peeksil Kapillaren (ähnliche Längen für beide Kapillaren) des Optimierungskits. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Änderung der Messrate konnte hierbei beobachtet werden, dass der Wechsel der Kapillaren einen deutlich größeren Einfluss auf die Leistung der Core-Shell Säule hatte als auf die Leistung der beiden mit vollporösen Partikeln gepackten Säulen (Abb. 2).

Die Effizienz der mit 2,6 µm Core-Shell Partikeln gepackten Säule wurde von 198.193 Böden pro Meter auf 229.207 Böden pro Meter erhöht. Das entspricht einer Steigerung um 15,6% gegenüber der alleinigen Erhöhung der Messrate (Tab. 1).

Schritt 3 von 3

Einfluss der Optimierung der Flusszelle

Im letzten Optimierungsschritt wurde die Standardflusszelle mit einem Volumen von 14 µl durch eine Mikroflusszelle mit einem Volumen von 2 µl ersetzt. Im Einklang mit den vorher erzeugten Daten hat der Wechsel von einer Standardflusszelle auf eine Mikroflusszelle einen deutlich größeren Einfluss auf die sub-3 µm Core-Shell Säule als auf die beiden anderen Säulen. Durch diesen Wechsel wurde die Effizienz der Core-Shell Säule auf 271.463 Böden pro Meter erhöht. Das entspricht einem Anstieg um 18,4% gegenüber den Ergebnissen der bisherigen Optimierungsschritte (Abb. 2).

Dieser Anstieg der Effizienz ist in einer geringeren Bandenverbreiterung des Peaks durch das geringere Volumen der Flusszelle begründet. Der Gesamteffekt dieser relativ einfachen Optimierungsschritte ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Leistung der mit vollporösen 5 µm Material gepackten Säule stieg insgesamt um 15,8%, während die Leistung der mit vollporösem 3 µm Material gepackten Säule um 19,5% anstieg. Allerdings war der Leistungsanstieg für die Core-Shell Säule am deutlichsten. Der Anstieg der Trenneffizienz betrug 83% gegenüber den Ausgangsbedingungen auf dem nicht optimierten System. Die endgültige Bodenzahl lag hier bei 271.463 Böden pro Meter auf einem optimierten Standard HPLC System. Dieser Wert für die Trenneffizienz ist nur 3,8% niedriger als der Wert, der mit derselben Säule auf dem UHPLC System erreicht wurde. Dieser Wert für die Trenneffizienz ist außerdem vergleichbar mit den Werten, die von mit vollporösem sub-2 µm gepackten Säulen erzielt werden.

Erzwungenes Abbauprofil eines pharmazeutischen Wirkstoffs

Um zu zeigen, dass die Ergebnisse auch auf Bedingungen übertragen werden können, die näher an den Gegebenheiten realer Methoden liegen, wurde ein weiterer Satz an Proben analysiert.

In diesem Fall wurde ein proprietärer pharmazeutischer Wirkstoff (eine moderat hydrophobe, saure Verbindung) für 24 Stunden einer sauren Hydrolyse unterzogen, um den Wirkstoffabbau zu erzwingen. Die so erzeugte Probe wurde anschließend unter Gradientenbedingungen auf dem HPLC System und dem UHPLC System mit derselben Core-Shell Säule (100 x 4,6 mm) analysiert. Die Chromatogramme (Abb. 5) zeigen deutlich, dass die Optimierung des Systems nicht nur wie zuvor einen dramatischen Effekt auf die berechnete Säuleneffizienz hat, sondern auch auf die Gesamttrennleistung für das Abbauprofil. Zum Beispiel lag die Auflösung für die nahe beieinander eluierenden Verunreinigungen B

und C bei 2,30 auf dem optimierten HPLC System und bei 2,36 auf dem UHPLC System.

Zusammenfassung

Die in diesem Artikel präsentierten Ergebnisse zeigen, dass mit der richtigen Optimierung eines Standard HPLC Systems (Messrate, Kapillarverbindungen und Detektorflusszelle) möglich ist, mit Hilfe von sub-3 µm Core-Shell Materialien (in diesem Fall Kinetex 2,6 µm) auf einem HPLC System UHPLC artige Trennleistungen zu erzielen. Durch diese einfachen Modifizierungen ist es den Anwendern möglich, die Leistung Ihrer bisherigen HPLC Systeme signifikant zu verbessern, ohne sich neue UHPLC Systeme anschaffen zu müssen.

Danksagung

Dieser Artikel wurde zuerst in ChromatographyToday Volume 5 Issue 2, 2012 publiziert. Die Autoren danken den Herausgebern für die Freigabe zur Übersetzung.

Literatur bei den Autoren erhältlich

Autoren
Jeff Layne und Simon Lomas,
Phenomenex, Inc.

► KONTAKT

Dr. Dirk Hansen
Marketing Manager Europe
Phenomenex, Aschaffenburg
Tel.: 06021/58830-0
Fax: 06021/58830-11
www.phenomenex.com