

UPLC - nye grænser for væskekromatografi

Ved at bruge stadig mindre partikler som pakkemateriale har man nået nye grænser for kromatografisk ydeevne. Med Ultra Performance Liquid Chromatography-teknikken kan man få flere informationer på kortere tid – og med stor resolution og følsomhed

Af Rune Buhl Frederiksen, Waters A/S

Gennem de sidste 30 år er HPLC blevet en af de mest benyttede teknikker i laboratoriet. Det skyldes, at HPLC er en dynamisk og alsidig teknik. Dynamisk i den række af applikationer den kan anvendes til, fra kapillær til præparativ skala, og alsidig i det væld af forskellige detektionsteknikker der kan anvendes, så et meget stort spektrum af kemiske stoffer kan analyseres.

I denne periode har HPLC udviklet sig inden for tre forskellige områder: Kolonner, detektorer og system/datastyring. Tilsammen har denne udvikling betydet en bred accept, som den mest anvendte separations/analyseteknik.

Figur 1. Disse van Deemter-plot illustrerer udviklingen mod mindre partikler gennem de seneste tre årtier. Lavere HETP (Height Equivalent to a Theoretical Plate) betyder højere bundantal og effektivitet. Selv for 2,5 μm partikler falder effektiviteten ved højere flowhastigheder. Ved UPLC og partikler $< 2 \mu\text{m}$ bevares effektiviteten ved højere flowhastigheder. Det er derfor muligt at udnytte et større område af van Deemter-plottet og opnå større resolution og kortere analysestid.

fremtiden ud for HPLC? Hvilken udvikling kan fortsat ekspandere anvendeligheden af denne veletablerede teknik?

Definitionen på UPLC

I disse år undersøges nye grænser for kromatografien. J. Jorgensen [1] fra University of North Carolina og M. Lee [2] fra University of Utah har for nylig offentliggjort resultater, der giver indblik i fremtidens muligheder for det kromatografiske laboratorium. Ved at bruge mindre og mindre partikler som kromatografisk pakkemateriale har de åbnet for nye grænser for kromatografisk ydeevne.

Jorgensen har rapporteret bundantal på over 300.000 på en kolonne pakket med 1 μm partikler. De grundlæggende principper for fremgangsmåden kan eksemplificeres af van Deemter-ligningen.

Det er en empirisk formel, der beskriver sammenhængen mellem mobilfasens lineære hastighed gennem kolonnen og bundantallet (kolonnens effektivitet). En af de betydende parametre for sammenhængen er partikelstørrelsen, der derfor

kan bruges til at karakterisere den teoretiske ydeevne for varierende partikelstørrelser (figur 1). Det kan udledes, at når partikelstørrelsen kommer under 2 μm , åbnes et nyt område inden for kromatografien, hvor man opnår større effektivitet (højere bundantal), uden at den mindskes ved større flowhastighed. Dvs. resolution og analysehastighed kan forbedres betydeligt. Den forøgede ydeevne kan defineres som Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). Figur 2 giver et eksempel på, hvad der kan opnås, ved at gå fra en 5 μm partikel til en 1,7 μm partikel.

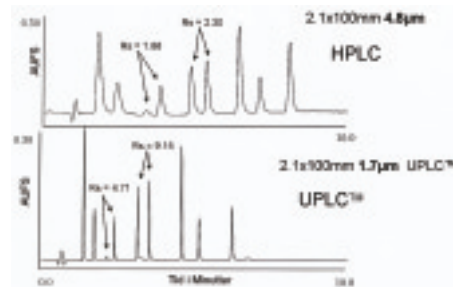
Resolution, følsomhed og analysehastighed

Med den øgede effektivitet de mindre partikler giver, kan resolution og analysehastighed optimeres. Det ses af van Deemter-

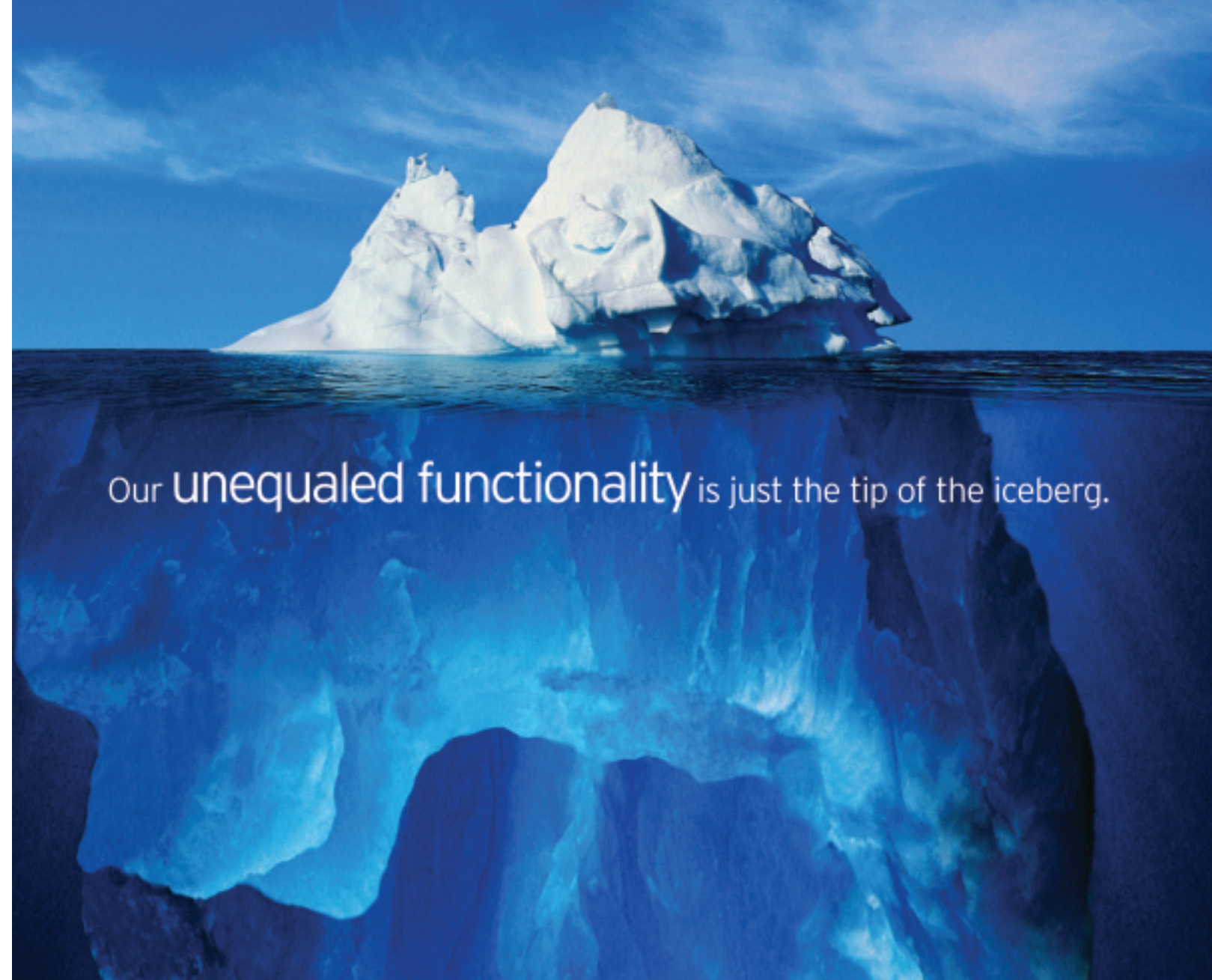
kurven i figur 1, at man ved at øge flowhastigheden kan bevare kolonnens effektivitet for partikler, der er mindre end 2 μm . Det betyder, at en separation kan optimeres mht. resolution og analysehastighed. I figur 3 er vist et eksempel, hvor man med UPLC har reduceret analysestiden fra 5,5 minutter (ved HPLC) til 0,5 minutter. Dette er vel at mærke sket under opretholdelse af den samme resolution. Det er opnået ved at gå fra en 3 mm partikel ved HPLC til en 1,7 μm partikel ved UPLC. Endvidere opnås en større følsomhed, idet toppene eluerer i et smallere bånd, hvilket giver større tophøjde.

Hvis man ønsker at anvende den optimale flowhastighed, og stadigvæk holde sig under trykgrænsen for dagens kommercielt tilgængelige HPLC-systemer, er 3 μm den nedre grænse for konventionelle HPLC-kolonner på 15 cm. Af van Deemter-ligningen fremgår det, at man må bruge partikler, der er mindre end 2 μm , for at realisere fordelene ved øget effektivitet. Det har hidtil kun været muligt, hvis kolonnens længde samtidig reduceres (typisk til 5 cm og derunder, hvilket medfører tab af effektivitet).

Hvilke krav stilles der til UPLC, for at den egentlige fordel ved at operere med mindre partikler kan realiseres?



Figur 2. Sammenligning af 5 μm versus 1,7 μm partikler. Resolution og topkapacitet øges betydeligt.



Our **unequaled functionality** is just the tip of the iceberg.

What's below the surface?

A system that won't become obsolete. LabWare LIMS is unique. Unlike other LIMS, ours promotes continuity and enables you to avoid dead-ends. LabWare's earliest customers are as satisfied as ever. What's more, they're running the latest version of our award-winning product and taking advantage of its advanced new features.

The industry's widest range of functional modules. LabWare LIMS is completely integrated, yet highly modular. Our industry-specific solutions are highly configurable in order to meet your exact requirements, and our single product is flexible enough to satisfy the diverse LIMS needs of your entire business.

A Configure Once—Deploy Anywhere™ architecture. LabWare LIMS enables you to take advantage of evolving technology. It offers multiple options for presenting the application such as rich client, thin client, web browser and wireless pocket PC. It's also compatible with all mainstream databases. You decide what's best for your business. LabWare LIMS won't hold you back.

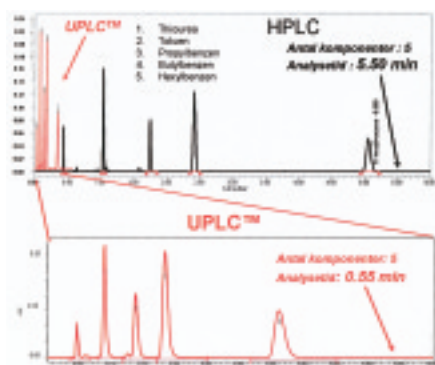
Lots of LIMS vendors *promise* success. LabWare has been delivering on this promise for years. Take a deeper look at what's made hundreds of companies successful.

Besøg os på
BioTech Forum/Scanlab
i Bella Center, København
den 5 - 7 oktober
Stand C4-025
Besøg www.labware.com
for mere information

LabWare Nordic
Landskronav. 25A, 252 32 Helsingborg, Sweden
Tel: +46 42 37 58 60 E-mail: info-nordic@labware.com
www.labware.com



OFFICES: U.S. • AUSTRALIA • SINGAPORE • SOUTH AFRICA • U.K. • FRANCE • GERMANY • RUSSIA • NORDIC • INDIA



Figur 3. Det øverste kromatogram er et overlay af en konventionel HPLC-analyse med brug af 3 μm partikler og en UPLC-analyse af samme stoffer med en 1,7 μm partikel. Det nederste kromatogram er en forstørrelse af de første 0,6 min af UPLC-kromatogrammet. Bemærk den betydeligt reducerede analysetid (5,5 versus 0,5 min) og at resolutionen er bibeholdt. Som en ekstra gevinst opnås en betydelig eluentbesparelse (> 3 ml pr. injektion).

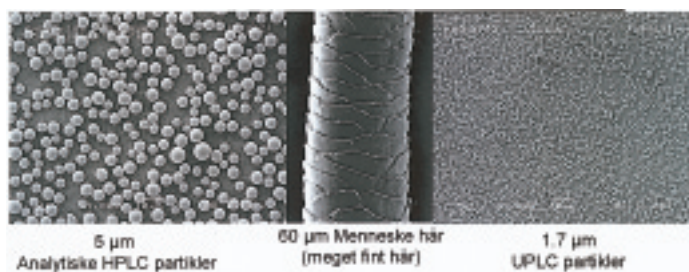
en porøs partikel udgør den ydre overflade < 1% af det samlede overfladeareal).

For at bruge UPLC har det været nødvendigt at udvikle en ny porøs partikel, der kan modstå de langt større tryk i UPLC sammenlignet med HPLC. Partiklerne skal pakkes tæt og ensartet, og kolonnens indre overflade skal være glattere for at gøre pakningen lettere. Filtrene i kolonnens ender skal redesignes, så de mindre partikler tilbageholdes, samtidig med at tilstopning forhindres.

Krav til selve UPLC-systemet

Størst mulig effektivitet opnås ved brug af partikler, der er mindre end 2 μm ved den optimale flowhastighed. Det ligger uden for de nuværende HPLC-systemers trykgrænser, der typisk er 6.000 p.s.i. ~ 400 bar.

Trykfaldet ved den optimale flowhastighed for maksimal effektivitet er for en 10 cm lang kolonne pakket med 1,7 μm partikler ~ 15.000 p.s.i. ~ 1.000 bar. Der skal derfor bruges en



Figur 4. for at illustrere den betydelige forskel mellem 5 μm og 1,7 μm partikler, ses her et elektronmikroskopisk billede af partiklerne sammenlignet med et menneskehår. Diameteren af menneskehåret svarer ca. til 12 af 5 μm partiklerne mod 33 af 1,7 μm partiklerne.

pumpe, der kan levere mobilfase ved dette tryk. En anden ting, der skal overvejes, er, at kompressibiliteten af solventer ved dette tryk er betydelig, specielt ved blanding af flere solventer og ved gradienteluering. En pumpe til UPLC skal derfor kunne mere end at pumpe ved et højt tryk. Den skal kunne kompensere for solventernes kompressibilitet over et stort trykområde for at opnå et stabilt og reproducerbart flow.

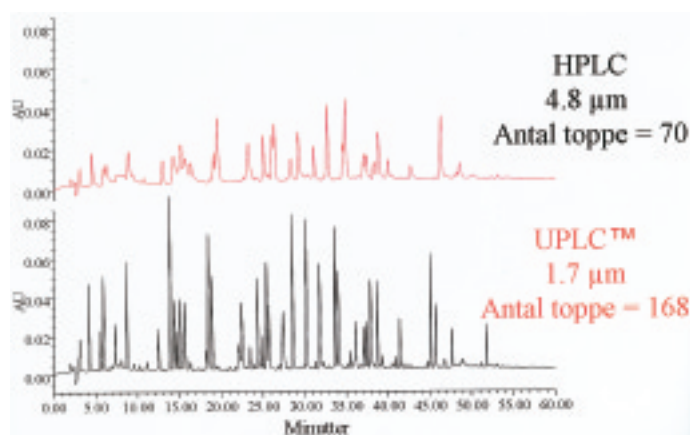
Injektion af prøven er også kritisk. Konventionelle injektionsventiler til HPLC er ikke designet til at modstå tryk op til

Udviklingen af partikler mindre end 2 μm

Udvikling og pakning af partikler mindre end 2 μm er en udfordring i sig selv. Figur 4 viser et elektronmikroskopisk billede af 5 μm og 1,7 μm partikler sammenlignet med et menneskehår. Non-porøse 1,5 μm partikler har været på markedet et stykke tid, og selv om disse giver større effektivitet, så har de lav kapacitet pga. det stærkt reducerede overfladeareal (for

1000 bar. For at beskytte kolonnen mod ekstreme trykvariationer skal injektionsprocessen være pulsfri. Det interne volumen i injektoren skal være så lavt så muligt for at reducere båndspredning af den injicerede prøve. Da analysetiden typisk er mindre end 1 minut, skal injektionscyklus være ekstrem hurtig, og prøvekapaciteten høj, hvis fordelene ved UPLC skal kunne realiseres. Små injektionsvolumener med minimal afsmittning fra prøve til prøve er nødvendigt, hvis den øgede følsomhed skal kunne udnyttes.

Topbredden ved UPLC er typisk < 1 sekund, hvilket stiller store krav til detektoren. Den skal have en høj dataopsamlingshastighed for at kunne opsamle tilstrækkeligt med datapunkter hen over en top, så nøjagtige og reproducerbare resultater kan opnås. Dernæst skal flowcellens volumen være så lavt som muligt for ikke at kompromittere den øgede resolution. Teoretisk øges følsomheden med en faktor 2-3 for UPLC sammen-



Figur 5. »Peptide map«. Øverste kromatogram er HPLC på en 4,8 μm kolonne. Nederst ses den samme prøve under nøjagtig samme betingelser blot på en 1,7 μm UPLC-kolonne. Antal detekterbare toppe er 70 for HPLC og 168 for UPLC. Bemærk at følsomheden er øget med en faktor 2-3.

lignet med HPLC. For MS-detektion er der store fordele forbundet med den øgede følsomhed, og her ses typisk 3 x større følsomhed ved interface af et UPLC-system til en MS-detektor sammenlignet med HPLC.

For applikationer som »peptide mapping«, hvor mange toppe skal separeres, byder UPLC på store forbedringer, som det ses af figur 5.

Konklusion

I en tid hvor der stilles større og større krav til effektivitet, og hvor grænserne for konventionel HPLC er under et stadigt pres, giver UPLC mulighed for at udvide og ekspandere denne udbredte separationsteknik. Med introduktion af kommercielle UPLC-systemer vil denne teknik opnå bred anerkendelse i laboratoriet.

E-mail-adresse

Rune Buhl Frederiksen: Rune_Frederiksen@waters.com

Referencer

1. Anton D. Jerkovich, J. Scott Mellors and James W. Jorgenson, »The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography.« LCGC North America Volume 21, Number 7 (2003)
2. N.Wu, D.C. Collins, J.A.Lippert, Y.Xiang, and M.L.Lee. »Ultrahigh Pressure LiquidChromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry for fast separations.« J.Microanal. Set. 12. 462 (2000).