

Die kleinen HPLC-Tipps im September 2016

## Übernahme einer Methode in die Routine, Formulierungen in PV's...

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Liebe HPLC-Anwender,

wir haben im letzten Jahr beschlossen, den September als Sommer-Monat zu definieren. Übrigens: ursprünglich galt er bei den Römern in der Tat als der siebte Monat (septem = sieben) und ein siebter Monat ist ein Sommermonat – „fertig“. Bei den heutigen „Kleinen“ geht es zu Beginn um einige Sachen, die mit der Übernahme einer Methode in die Routine zu tun haben, anschließend werde ich einige Formulierungen aus PV's zitieren.

- Eine Gradienten-Methode wurde mit einer Pumpe entwickelt, die keinen Pulsationsdämpfer enthielt. Das merkliche aber doch eher geringe Rauschen der Basislinie hat den Methodenentwickler nicht weiter gestört. Der Routineanwender hat für sein baugleiches Gerät einen Pulsationsdämpfer bestellt und einbauen lassen, weil er bei den zu erwartenden kleinen Peaks größere Probleme in der täglichen Integration verhindern wollte. Das Rauschen war tatsächlich signifikant kleiner geworden. Aber: Die Retentionszeit hat sich verschoben, das Chromatogramm sah anders aus. Erklärung: Durch den Pulsationsdämpfer hat sich das Verweilvolumen (Dwell volume) der Apparatur geändert und dies kann leider zu allem „Möglichen“ führen (1)
- Die Injektion von 1 µl stellt für moderne Autosampler absolut kein Problem dar. Gerätetechnisch wohl bemerkt. Das wissen Methodenentwickler und man kann es auch problemlos beweisen. Wenn es nicht unbedingt sein muss würde ich solche Volumina allerdings in der Routine nur bei sehr einfachen und wirklich klaren, niedrig-viskosen Probenlösungen injizieren wollen: Begründung: Bei hoch-viskosen Lösungen (z. B. rein wässrige oder sehr wasserreiche Probenlösungen), komplexen Matrices, Unterschieden zwischen Probenlösung und Eluent usw. ist kaum zu gewährleisten, dass eine 1 µl-Lösung stets eine gleichbleibende Homogenität aufweist. Große Variationskoeffizienten bei repetitiven Injektionen im Falle von kleinen Injektionsvolumina haben oft mit dieser Problematik zu tun - nicht mit der Qualität der Injektion an für sich. Injektionen mit 5, noch besser mit 10 µl sind „ehrlicher“ und präziser. Wir sprechen hier von zuverlässigen Ergebnissen im Routinebetrieb, nicht wenn man schnell das eine oder andere ausprobieren möchte.
- Für die Methodenentwicklung/Validierung wurde immer wieder ein Ansatz mit einer – im idealen Fall – realen Probe verwendet, man benutzte 1 oder 2 vials, es traten keine Probleme auf. In der Routine ist die Anzahl der Proben natürlich größer, der Rack im Autosampler ist voll. Kann bei den letzten Proben bei *diesen* Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit im Autosampler in

den Sommermonaten, Stabilität von Farbstoffen etc.) etwas passieren?  
Denken Sie bitte im Falle von zusätzlichen Peaks, breiteren Peaks usw. nur bei den späten Proben an die eben geschilderte Situation.

- An dieser Stelle hatte ich vor einiger Zeit Ihnen eine Möglichkeit geschildert, wie die Säulenstabilität in der Routine überprüft werden kann: bei etwas „aggressiven“ Bedingungen bzgl. Temperatur, pH-Wertes etc. oder (in der „light“-Version bei den üblichen Bedingungen) werden reale Proben über´s Wochenende vermessen. Am Montag früh können die an die Methode gestellten Anforderungen (z. B. Auflösung, Asymmetriefaktor, Bodenzahl usw.) mithilfe der Zahlenwerte von Freitag verglichen und der Säulenzustand gemäß intern vereinbarten Kriterien individuell bewertet werden. So weit so gut. In diesem Zusammenhang würde ich nicht lediglich Zahlenwerte vergleichen wollen, sondern deren Veränderung im Laufe der Zeit: schauen Sie sich mithilfe einer Qualitätsregelkarte (mit Excel eine Sache von Minuten) die Veränderungen an. Der Verlauf liefert mehr Informationen als lediglich der Vergleich von Zahlenwerten, z. B.: Nimmt die Asymmetrie kontinuierlich oder verstärkt ab der 200-ten Injektion ab? Korreliert eine mögliche Druckerhöhung mit einer Abnahme der Bodenzahl? War die ganze Zeit alles OK und sind die Werte erst ab 4.00 Uhr Montagmorgen „komisch“, weil die Probe erst ab diesem Zeitpunkt evtl. anfängt, sich zu zersetzen etc.

Unglückliche Formulierungen in Prüfvorschriften sind mehr als ärgerlich und das ist leider kein seltenes Phänomen, man könnte hier mehrere DIN A0-Blätter füllen... Nachfolgend zitiere ich aus PV's, die ich immer wieder zur Bewertung erhalte. Wenn Sie solche oder ähnliche Fälle haben, sollten Sie sich bitte nicht wundern, wenn bei Ihnen in der Routine Reproduzierbarkeitsprobleme auftauchen:

*„... und gegebenenfalls mit  $KH_2PO_4$  bzw. mit  $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$  auf  $pH = 5,80 \pm 0,05$  eingestellt...“*

Je nachdem mit was der pH-Wert eingestellt wird, ergibt sich eine andere Pufferstärke und der pH wird vermutlich nicht konstant bleiben können.

*„Detector cell: 10 mm“*

Diese Angabe ist unzureichend, denn: bei gleichem Lichtweg von 10 mm und einmal einem Zellvolumen von 2 µl und einmal von 8 µl ergibt sich eine andere Peakform und demnach können die Nachweisgrenze, die Bodenzahl, die Peaksymmetrie sich ändern.

*„Temperature : 30 °C“*

Auch diese Angabe ist nicht ausreichend, es fehlt als Angabe die Art des Säulenofens: so ist beispielsweise ein Ruhluftofen eher ein adiabatisches System, ein Umluftofen eher ein isothermisches System, d.h. die Wärmeabfuhr ist unterschiedlich: In einem solchen Fall können sich eine

Retentionszeitverschiebung, eine Verschlechterung/Verbesserung der Auflösung, eine Elutionsumkehr ergeben – und in worst case das alles in einem Chromatogramm (2).

*„... dissolve 18 ml ortho-phosphoric acid 85% in 100 ml demin. water...“*

und etwas weiter:

*“... dissolve 200 g 2-propanol to 1000 ml demin. water...”*

Ich bin mir nicht sicher, ob alle Beteiligten den Unterschied, einmal in 100 ml“ und einmal to 1000 ml“ bewusst registrieren und demnach die gleiche Vorgehensweise beim Ansetzen der Lösungen an den Tag legen.

- (1) Stavros Kromidas, Frank Steiner, Stefan Lamotte „Aspekte der Gradienten-Optimierung“ in Stavros Kromidas (Hrsg.) „Der HPLC-Experte, Wiley-VCH
- (2) Michael Heidorn, Frank Steiner „Der Säulentermostat – eine einfache Angelegenheit?“ in Stavros Kromidas (Hrsg.) „Der HPLC-Experte II, Wiley-VCH