

Der HPLC-Tipp im Mai

Andauernde Probleme beim Methodentransfer? Fahr´ hin!

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Der Fall

Eine Methode wird transferiert. Trotz idealen Voraussetzungen, das wären beispielsweise identische Hard- und Software in den beteiligten Labors, qualifizierte Geräte, vorhandenes Know-how der Anwender hier und dort usw. sind die Ergebnisse alles andere als zufriedenstellend. Die auftretenden Probleme können vielfältiger Natur sein: Starkes Basislinie-Rauschen, Verschiebung der Retentionszeit, mangelnde Reproduzierbarkeit der Peakflächen etc. Mehrere e-mails oder auch Telefonkonferenzen bringen keine wirkliche Lösung. Was ist zu tun?

Die Lösung

Gleich zu Beginn meine Empfehlung: Handelt es sich um eine wichtige Methode und ist das Problem nach drei bis vier E-mails/Telefonaten nicht zu lösen? Fahren/fliegen Sie hin. „Sie“, der/die Anwender(in) oder der/die fachkundige Vorgesetzte. Auch ein merklicher monetärer und zeitlicher Aufwand, so z. B. von 4.000 bis 5.000 Euro und vier bis sechs Tagen, erscheint mir als gerechtfertigt. Warum das Ganze? Es gibt eine Reihe von relevanten Unterschieden, die nur vor Ort festzustellen sind. Nachfolgend skizziere ich ein paar eigene Erlebnisse, die Beispiele lassen sich beliebig fortführen.

- Da wären zunächst apparative Verschiedenheiten, die evtl. nicht bedacht werden, weil der Focus lediglich auf der Feststellung liegt: „Gleicher Hersteller, identischer Hardwaretyp“:
 - Anderes Schleifenvolumen am Autosampler, Säulenwechsler vorhanden ja/nein, zusätzliches Verbindungsstück; dies alles führt zu einem veränderten Verweilvolumen einer Gradientenanlage (Volumen von der Mischkammer bis zum Säulenkopf), welches das Chromatogramm beeinflussen kann. Fatal: Letztes Jahr traten beim Transfer einer isokratischen Methode bei gleichen Beteiligten keine Probleme auf... Begründung: Die Verweilvolumina der zwei Anlagen sind womöglich unterschiedlich, das Totvolumen (Volumen zwischen Autosampler und Detektor ohne Säule) beider Geräte jedoch identisch und nur dieses ist bei isokratischen Methoden relevant...
 - Unterschiede bei den Einstellparametern wie Sample Rate, Response Time, Bandwidth, Slit – jene Werte sind in der Prüfvorschrift nicht immer angegeben. Und solche Einstellparameter können Peakform, Auflösung und Integration und somit die Peakfläche (sowohl absolut als auch deren Reproduzierbarkeit) beeinflussen
 - Stahl-, Keramik-, Glas-, Titan- oder Kunststoff-Ansaugfritte?

- Relativ neue Septen für die Vials vs. alte (letzte: Günstiger, deswegen große Mengen gekauft): Die „alten“ dunkelroten bröseln, kleine Krümel verstopfen die Nadel, das Ergebnis lautet: Fehlerhafte oder unreproduzierbare Peakfläche
- Die Vials werden beim günstigen, lokalen Anbieter gekauft, die Glasbeschaffenheit ist anders als beim Originalhersteller, Ergebnis: Teil-Adsorption von Proteinen, mangelnde Reproduzierbarkeit der Peakfläche, evtl. Geisterpeaks
- In einem Labor befinden sich viele Geräte; die merkliche Wärmeentwicklung kann Auflösung, Rauschen, Basislinie und im Worst Case auch Retentionszeit beeinflussen
- In einem Labor werden morgens direkt Gummihandschuhe angezogen und diese erst am Ende des Arbeitstages ausgezogen... Im anderen Labor werden zwar keine Handschuhe verwendet, dafür werden aber die Hände tagsüber recht häufig gewaschen. Hier Geisterpeaks, dort nicht
- „The beauty of slowness“: Ein Labor beim deutschen Mutterkonzern hat viele Proben zu messen, die Geräte laufen quasi rund um die Uhr, die Anwender sind froh, dass sie das Probenaufkommen gerade noch bewältigen. Im Labor des Tochterunternehmens in einem anderen Kontinent herrscht eine etwas andere Arbeitskultur: Freitags am Nachmittag lässt man die Arbeitswoche mit ausgiebigem Plaudern bei Kaffee und Kuchen ausklingen. Während dieser Zeit werden allerdings die Geräte sehr gründlich mit heißem Wasser und Isopropanol gespült, diese Lösungsmittel (manchmal auch zusätzlich 0,01 N HNO₃ und DMSO) werden auch mehrmals injiziert. Im ersten Labor: „Buckel“ in der Basislinie, Geisterpeaks, Memory-Effekt. Im Zweiten: Null Probleme
- Nachfolgend stichwortartig und beispielhaft einige weitere Punkte:
 - Glasgebäude; Feuchtigkeit 12%, Verschiebung der Retentionszeit
 - Monsumzeit; durch die starke Feuchtigkeit recht viel Wasser im Autosampler, die vials/das Rack werden/wird etwas höher gestellt, Ergebnis: Fehlinjektionen
 - Schüttelautomat; wie wird geschüttelt? Befindet sich womöglich auf der einen Seite in unmittelbarer Nähe eine Kapillar-GC, die alle halbe Stunde eine „Hitzewelle“ aussendet? Kann dies die Ursache für schwankende Gehalte sein? Und das nur montags und donnerstags?
 - Wird üblicherweise Acetonitril bei ca. 1/5 Rest-Inhalt in der Flasche aufgefüllt oder lässt man die Flasche leer werden, spült sie, lässt sie trocken werden und füllt sie erst dann wieder auf? Im ersten Fall evtl. Aceton-Atmosphäre über der ACN-Oberfläche in der Vorratsflasche (Drift der Basislinie beim UV-Detektor) oder Polymerbildung („Buckel“ bzw. „Wellen“ in der Basislinie)

Das Fazit

Den weiter oben erwähnten Besuch bei den „Anderen“ sollte man als lohnende Investition denn als lästige Reise verbuchen, sollte ein wichtiger Methodentransfer

nicht in angemessener Zeit gelingen. Wiederholmessungen oder gar „notwendig“ erscheinende Revalidierung können schnell einiges an Zeit und Folgekosten bedeuten. Viele HPLC-beeinflussende Faktoren inkl. Unterschieden von Abläufen und individueller Arbeitsweise sind oft nur vor Ort sichtbar.