Der HPLC-Tipp im Juli/August

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Analytischer Methodentransfer von HPLC-Methoden – Teil 3

Im zweiten Teil der kleinen Tipps-Serie zum Methodentransfer von HPLC-Methoden hat Mike Hillebrand auf fehlende Infos beim Methodentransfer hingewiesen. Fehlende Infos dürften in der Tat eine der häufigsten Ursachen für missglückte Methodentransfers sein. Im dritten und letzten Tipp zu diesem Thema greife ich daher diese Problematik erneut auf, dabei beschränke ich mich auf zwei Feldern: Beispielhaft werden weiter unten relevante Informationen bzgl. Hardware bzw. „Probe auflösen“ genannt, die leider nicht immer weiter gegeben werden. Diese Liste ist natürlich beliebig erweiterbar.

- **Infos betreffend die HPLC-Anlage – gleiche Anlage, anderes Ergebnis**

- Man verwendet eine baugleiche Gradientenanlage und geht folglich davon aus, dass auch das Verweilvolumen („Dwell Volume“) identisch ist. Wurde jedoch vor einiger Zeit das Loopvolumen beim Autosampler vielleicht verändert oder befindet sich bei der einen Anlage im Säulenofen lediglich die betreffende Säule und bei der Anderen ein Säulenwechsler? Oder hat man ein Verbindungsstück zwischen Säule und Detektor eingebaut, weil die Kapillare zu kurz war usw.? Das alles verändert das Verweilvolumen und dieses kann ja das Chromatogramm beeinflussen.

- In einem Labor arbeitet man beim Diodenarray mit einem Spalt („Slit“) von 1,2 oder 2 nm, da man häufig wegen Peakpurity-Tests UV-Spektren aufnimmt. Im anderen Labor herrscht die Philosophie, lieber viel Licht zu zu lassen (16 nm), um noch kleine Peaks sicherer integrieren zu können (kleiner Spalt: gute spektrale Auflösung, großer Spalt: gute Nachweisempfindlichkeit). Ergebnisse sind schwerlich vergleichbar, da möglicherweise nicht nur anders integriert wird sondern sich auch eine andere qualitative Information ergibt.

- Man vergisst beim Methodentransfer zu vermerken, dass man beim Autosampler schon länger mit einer Titan- oder Messingnadel arbeitet, um so störende Memoryeffekte und schwankende Peakflächen zu vermeiden. Das aufnehmende Labor verwendet die klassische Stahlnadel und wegen des hydrophoben Charakters von Stahloberflächen erhält man „unerklärliche“, schwankende Werte. Analog: Peek- vs. Stahlkapillaren.

- In einem Labor eines Dienstleisters ist der Autosampler mit einer schwarzen Folie abgedeckt, weil man es „satt“ hatte, dass das Gerät permanent ausstieg. Und „man“ weiß ja, dass bei *diesem* Gerät die Elektronik des Autosamplers im falle direkter Sonneneinstrahlung gehörige Probleme bereitet. Der Kunde kauft das gleiche Gerät, beim Aufstellen durch den Hersteller fehlt natürlich besagte Folie, der Methodentransfer findet statt – und die Anzahl der verzweifelten mails steigt und steigt…

- **Infos betreffend das Auflösen der Probe – folgende Hinweise fehlen manchmal:**

- Die Probe ist lichtempfindlich, es werden „selbstverständlich“ braune vials verwendet – hat man daran gedacht, diesen kleinen Hinweis weiter zu geben?

- Die Probe ist fest, deswegen werden Stahlspatel und Wägehütchen aus Aluminium verwendet, denn: Die Oberfläche eines Kunststoffspatels (denke auch an Plastik-Handschuhen) kann statisch aufgeladen werden; kleine Krümelchen des Wägeguts können wegfliegen oder aber der Kunststoffspatel schlägt immer wieder an der Wand des Behältnisses/des Wägehütchens. Auch hier könnten schwankende Werte die Folge sein.

- Ungewöhnliche Beobachtungen sollten Erwähnung finden: Bei Schaumbildung sieht man nicht immer, ob die Probe richtig aufgelöst wird, also sollte man beim automatischen Auflösen darauf achten (Drehzahl), dass der Schaum sich in grenzen hält.

- Man weiß in einem Labor um die Neigung des betreffenden Analyten zur Adsorption („Physisorption“, Adhäsion) auf allerlei Oberflächen. Man trifft die richtigen Vorsichtsmaßnahmen, alles klappt wunderbar. Hat man daran gedacht, alle getroffenen Maßnahmen sauber zu dokumentieren und zu kommunizieren? Z. B: Man verwende nur *diese* Produkte mit einer inerten Glasoberfläche oder man sollte auf keinen Fall Glas- sondern nur PP-Behältnisse nutzen, die Filter sollten so und so „aktiviert“/inert gemacht werden, es sollten nur PEEK-Kapillaren, keine vorgeschlitzte oder umgekehrt nur Silikon-Septen verwendet werden usw.

- Häufig wird die Probe im Ultraschallbad aufgelöst; nun, manch´ eine labile Komponente kann sich durch die Ultrabeschallung verändern. Dieses Risiko kann und sollte im Rahmen der Überprüfung der Robustheit bei der Validierung überprüft werden. Das ist (leider) selten der Fall. Nehmen wir an, man überprüft es doch und es ergibt sich tatsächlich, dass die Substanz sich nur bei bestimmten Bedingungen nicht zersetzt. Die Energieverteilung hängt von vielen Faktoren ab. Wir haben uns bereits an dieser Stelle ausführlich über den Einfluss des Ultraschallbads auf die Stabilität von Substanzen unterhalten, deswegen nachfolgend nur stichwortartig Faktoren, die einen Einfluss haben können:

- Größe und Geometrie des Ultraschallbads (rund/eckig), Energie (30 oder 50 kHz?) Wassermenge, welches Wasser (Kranwasser, destilliertes Wasser, Kranwasser mit Natriumazid), Probe im Drahtgestell/Becherglas, gekühltes vs. ungekühltes U-Bad, aktuelle Temperatur, befindet sich womöglich eine thermolabile Probe direkt an der warmen Innenwand, steht das U-Bad auf der Labortisch-Oberfläche (welche?) oder auf „Füßchen“, ist die Ultraschallenergie

gleich verteilt, wenn nicht: Hat man vielleicht deswegen ein Tropfen Spüli oder etwas Isopropanol hinein getan? Die Überprüfung der Ultraschallenergie insgesamt oder lokal ist übrigens möglich neben der bekannten Alufolie auf der Wasseroberfläche eleganter z. B. mit SonoCheck, siehe www.pereg.de. Zugegebenerweise: Probleme bzgl. Stabilität treten bei einer Behandlung unter ca. 5 min selten auf; dennoch lohnt es sich im Falle von labilen Komponenten (Vitamine, bestimmte Aminosäuren) die Sache im Auge zu behalten.

Fazit:

Auch Kleinigkeiten können HPLC-Ergebnisse beeinflussen. Es gilt, kritische Einflussfaktoren nicht nur zu identifizieren sondern sie im Falle von Methodentransfers präzise und umfänglich zu nennen. Das geht von Details bei der Probenvorbereitung (z. B. Gefahr von Sorption an „hungrigen“ Oberflächen sowie getroffene Maßnahamen) über Infos zur Anlage (z. B. Verweilvolumen) bis hin zu den Einstellungen (z. B. Bandwidth, Slit, Sample Rate, Aufziehgeschwindigkeit bei der Injektion) und zur Integration (wann Valley-to-Valley und wann Lot fällen).