

Gerätetests in der HPLC

Autor: Dr. Stavros Kromidas

Zum Dokument

Dieses Dokument gibt einen Überblick über die wichtigsten Tests für eine HPLC-Anlage. Zudem werden wichtige Begriffe erläutert, die im Umfeld der Tests von Bedeutung sind. Das Wissen um die Güte der eingesetzten Instrumente ist zu einer elementaren Pflicht des Labors geworden – auch ohne behördliche Anforderung. Im Folgenden werden Tests zur Überprüfung der drei wesentlichen Bestandteile einer HPLC-Apparatur Pumpe, Injektionssystem, Detektion, vorgestellt. Er schließt eine Gewichtung der einzelnen Tests und die Angabe von Erfahrungs-/ Sollwerten ein.

Bemerkung

Das Vorstellen dieser Tests bedeutet keines Falls, dass der Autor jene empfiehlt, zumal die Durchführung einen beträchtlichen Aufwand bedeuten. Das Ziel vielmehr ist es, dem Anwender eine detaillierte Erklärung zu geben, was und warum etwas getestet wird. Die Meinung des Autors diesbezüglich lautet: Die Doppelinjektion einer „realen“, stabilen Probenlösung vor einer Meßserie und der Vergleich mit bekannten Werten wie z. B. Peakflächen, Bodenzahlen (ideales Instrument dazu: Qualitätsregelkarte) kann die tägliche, aufwendige Überprüfung zum Teil ersetzen – oder man braucht diese Überprüfung zumindest in größeren Zeitabständen durchführen.

Inhaltsangabe

Abschnitt	Thema	Seite
01	Tests zur Überprüfung einer HPLC-Anlage	4
1.1	Einige grundsätzliche Begriffe Qualifizierung, Verifizierung, oder Validierung einer HPLC-Anlage?	4
1.2	Gerätetests	5
1.3	Gewichtung der Tests	8
1.4	Inject-, Pumpen- oder Messpräzision?	11
1.5	Gerätetests in Routine und Forschung	13
1.6	Messpräzision unter Wiederholbedingungen	14
1.7	Schema zur Überprüfung einer HPLC-Anlage	16

02	Wichtige Begriffe für die Pumpe	18
03	Literatur	21

Einige grundsätzliche Begriffe

Qualifizierung, Verifizierung oder Validierung einer HPLC-Anlage?

- ISO 8402** Im Bereich der analytischen Qualitätssicherung werden QM-relevante Begriffe uneinheitlich benutzt; dazu zwei Definitionen aus der ISO 8402 von 1994:
- Verifizierung** Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellen eines Nachweises, dass **festgelegte Forderungen** erfüllt worden sind.
- Validierung** Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellen eines Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen **speziellen, beabsichtigten Gebrauch** erfüllt worden sind.
- Qualifizierung** Der Begriff kommt aus dem geregelten Bereich (GMP) und bedeutet vereinfacht soviel, dass ein Instrument ohne Messgut auf die Funktionstüchtigkeit hin überprüft wird.

Auf die HPLC übertragen bedeutet dies folgendes:

Qualifizierung = Überprüfung der Gerätespezifikation ohne Eluent und Probe

Beispiele:

Lampenenergie des Detektors:

Wird ein bestimmter Wert erreicht?

Temperaturkonstanz des Säulenofens:

Ist im gesamten Messbereich der vom Hersteller angegebene Temperaturkonstanz von $\pm 0,1^\circ \text{C}$ erreichbar?

Bemerkung

Unabhängig von diesen Definitionen wird heute häufig unter Qualifizierung, die Überprüfung des Gerätes – z. B. nach einem Umbau oder Geräteumzug – mithilfe festgelegter Tests und Standardlösungen verstanden.

Gerätetests in der HPLC

- Voraussetzungen** Bevor auf die eigentlichen Tests eingegangen wird, hier drei Vorbemerkungen:

1. Die Säule dient zur Lösung von individuellen Trennproblemen; diese sind nicht zu standardisieren, somit ist die Säule nicht Bestandteil eines Gerätetests. Hilfreich zur Beurteilung einer HPLC-Säule sind dennoch Daten u. a. über die Packungsqualität z. B. ca. 70 – 80.000 Böden/m für spherisches 5 µm RP-C₁₈ Material.

2. Peripheriegeräte wie z. B. Degasser, Fraktionssammler, Säulenschaltventile bleiben außer acht, hier wird auf die Angaben der Hersteller verwiesen.
3. Ebenfalls außer acht bleibt wegen des Umfangs der Komplex Qualifizierung bzw. Validierung von Computersystemen.

In Tab. 1 sind die Gerätetests aufgeführt. Dazu einige ergänzende Kommentare.

Tabelle 1

Gerätetests in der HPLC

Was wird getestet?	Wie wird getestet?	Wichtig für/bei (a)... evtl. auftretendes Problem (b)
Gesamtsystem	Präzision der Peakfläche einer Komponente bei einer 6-fachen Injektion unter Wiederholbedingungen: Überprüfung von Pumpe und Injektor	* a) System- oder Messpräzision; Übliche Anforderung: $V_K : 1-2\%$
Pumpe Flussrichtigkeit	Stoppuhr/Messzylinder, „Flowmeter“	b) Methodenübertragung (absolute Retentionszeiten)
Langzeitflusskonstanz	6-fache Injektion, Reproduzierbarkeit der Retentionszeit ($V_K \approx 0,2 - 0,4 \%$)	Große Anzahl von Komponenten, Gefahr: Verwechslung von Peaks
Kurzzeitflusskonstanz	nominierte Peakfläche, Flächenprozente ($V_K \leq 0,5 \%$)	a) Quantitative Analyse, Auswertung über die Fläche
Flussschwankungen	Basislinie mit/ohne Fluss	Spurenbestimmungen
Dichtigkeit	Drucktest	Nicht konstanter Fluss, Druckabnahme
Gradient (Qualität und Reproduzierbarkeit der Durchmischung)	Stufengradient, 6 x aufgenommen	Reproduzierbare Retentionszeiten
Verweilvolumen (Volumen der Apparatur von der Mischkammer bis zur Säule)	Eluent A: MeOH Eluent B: MeOH + 0,1 % Aceton, linearer Gradient und $V = \text{Fluss} \times \text{Zeit}$ (Verzögerungszeit bis der Gradient wirksam wird))	Methodenübertragung

Injektionssystem		
Richtigkeit*	<ul style="list-style-type: none"> ergibt das 1, 2, 3-fache Injektionsvolumen die 1, 2, 3-fache Fläche? (Fluss, Detektor in Ordnung) gravimetrisch 	Quantitative Auswertung, falsches Ergebnis
Präzision *	<ul style="list-style-type: none"> 6 Injektionen; a) Konstanz der Peakhöhe? b) Indirekt aus der Gesamtpräzision minus Präzision der Flächenprozente 	a) quantitative Auswertung, b) unpräzises Ergebnis $V_K \approx 0,2 - 0,3 \%$
Verschleppung	a) Injektion einer hochkonzentrierten Lösung, anschließend Injektion von reinem Eluent; das Peakrauschverhältnis sollte <2:1 sein	a) Quantitative Auswertung
Säule	Objektives Kriterium: Bodenzahl z. B. 5 µm : $\approx 60.000 - 80.000$ Böden/m 3 µm : ≈ 100.000 Böden/m Sonstige Tests: applikationsbedingt	Vergleich von Säulen bezüglich Packungsqualität Bemerkung: Bodenzahlen sind nur bei gleichen chromatographischen Bedingungen und gleiche Berechnungsformel vergleichbar
Detektor		
Wellenlängenrichtigkeit	Mittels Filter (z. B. Holmiumoxid, 361 nm, 453,7 nm) oder Mustersubstanzen (Terbiumperchlorat 218,5 nm oder Erbiumperchlorat 254,6 nm)	a) Quantitative Auswertung b) falsche Fläche
Wellenlängenpräzision (-genauigkeit)	$\pm \text{nm} = f(t)$, z. B. durch Dejustage der Optik	a) verschobene Spektren b) falsche Zuordnung
Rauschen	z. B. UV < 0,004 mAU	a) Unreproduzierbare Ergebnisse b) unterschiedliche Fläche
Drift	z. B. UV 0,3 – 0,6 mAU/h	Fehler bei der Auswertung von Peaks
Linearität *	6 (19) Konzentrationen. (Matrix)	Quantitative Auswertung

Lampenenergie *	Diagnostikwerte am Gerät oder/und Vergleich aktuelles/“gutes“ Chromatogramm	UV: „nur“ schlechtes Peak-Rauschverhältnis, Fluoreszenz: kleinere Peakfläche
PC	Algorithmen in Ordnung? Ergebnis per Hand nachrechnen, sonst recht aufwendig	Systematische und Zufallsfehler

Gewichtung der Tests

Wichtige Tests Mit einem * sind die Tests gekennzeichnet, die oft als „Muss“ angesehen werden. Ob die übrigen Tests durchgeführt werden oder nicht, wird individuell von Fall zu Fall entschieden.

Begründung und Beispiele

- | | |
|---|--|
| Abhängigkeiten von der Langzeitkonstanz | 1. Natürlich ist die Langzeitkonstanz der Pumpe wichtig. Eine geringe Langzeitkonstanz führt zu einer Nicht-Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten. Diese ist jedoch selten so gravierend, dass es allein durch sie zu einer Verwechslung von Peaks kommen kann. Soll allerdings die injizierte Menge über die Fläche ausgewertet werden, ist die Kurzzeitkonstanz der Pumpe sehr wichtig, denn diese fließt direkt in das Ergebnis ein! |
| Abhängigkeiten von der Kurzzeitkonstanz | Injizierte Menge = Fläche x Fluss

Man sollte sich daher beim „Pumpentest“ nicht nur mit der Überprüfung der Richtigkeit der Flussrate begnügen, sondern sich die Reproduzierbarkeit der Peakflächen anschauen. |
| Abhängigkeiten von der Richtigkeit der Injektion | 2. Durch teilweise irreversible Sorption bestimmter Substanzen (Proteine, Zucker) im Injektionssystem schleicht sich unbemerkt ein proportional systematischer Fehler ein. Die Überprüfung der Richtigkeit der Injektion mit realen Proben ist in diesem Fall genauso wichtig wie die Messgenauigkeit. |
| Memory- Effekt | 3. Stellt der Memory-Effekt in der Qualitätskontrolle eher selten ein Problem dar, ist er z. B. bei radioaktivem Material und Umwelt- oder biologischen Proben oft ein leidiges Thema (irreversible Adsorption an der Injektionsnadel!) |
| UV-Detektor Rauschen Drift Empfindlichkeit | 4. Wenn im Labor ein UV-Detektor getestet wird, dann doch traditionell meist die Linearität und die Lampenenergie, etwas seltener auch das Rauschen und die Drift. Bei einer Gehaltsbestimmung ohne Nebenkomponenten ist die Empfindlichkeit nun sicherlich nicht das große Thema. Eine falsche oder ungeeignete Wellenlänge jedoch kann in ungünstigen Fällen – Messungen an einer UV-Flanke – zu enormen Fehlern und falschen Aussagen führen. |

Voraussetzung für eigene Testmischung Selbstverständlich kann für eine andere Testlösung, z. B. der eigene Standard, und andere chromatographische Bedingungen entschieden werden. Für die ausgewählte Testmischung gelten folgende Voraussetzungen:

- keine Messung an einer UV- Flanke,
- stabile Proben,
- keine irreversible Sorption an der stationären Phase.

Ermittlung der Systempräzision Das beschriebene Gemisch, s. o., wird 6 Mal injiziert und über den Mittelwert und die Standardabweichung der 6 Flächenwerte die Systempräzision, σ_{Gesamt} , ermittelt. Im vorliegenden Fall können alle Fehler bis auf den Fehler der Pumpe und des Injektionssystems als nicht vorhanden bzw. als minimal vernachlässigt werden:

Fehler von: Säule 4 Substanzen, 4 Peaks, kein Fehler

Detektor Die 6 Injektionen erfolgen unmittelbar hintereinander, somit identischer Zustand der Lampe, Zelle etc., vernachlässigbarer Fehler

Kapillaren Verbindungsstücke, Kapillaren etc.:
Identisch bei jeder Injektion, kein Fehler

Auswertung Symmetrische Peaks, vernachlässigbarer Integrationsfehler.

Somit ergibt sich:

$$\sigma_{\text{Gesamt}}^2 = \sigma_{\text{Pumpe}}^2 + \sigma_{\text{Injektion}}^2$$

Fehler der Pumpe Die Standardabweichung der absoluten Fläche bei den sechs Injektionen ergeben die Präzision (Fehler) des Gesamtsystems. Mit folgendem, einfachen Trick kann der Fehler der Pumpe und der Injektion einzeln ermittelt werden: Man nehme die Fläche der vier Peaks und nominiere sie auf 100% (100%-Methode). Die Standardabweichung der Flächenprozente ergibt nun nur den Fehler der Pumpe. Denn unabhängig davon, ob z. B. 10, 11 oder 12 μl injiziert werden, entspricht die Fläche eines Peaks, bei jeweils gleicher Konzentration der Komponenten, bei einer Injektion stets 25 % der normierten Gesamtfläche. Durch eine Umformung der obigen Gleichung kann jetzt der Fehler der Injektion errechnet werden:

$$\sigma_{\text{Injektion}}^2 = \sigma_{\text{Gesamt}}^2 - \sigma_{\text{Pumpe}}^2$$

$$\sigma_{\text{Injektion}} = \sqrt{\sigma_{\text{Gesamt}}^2 - \sigma_{\text{Pumpe}}^2}$$

Weiterhin wird in der Regel die Apparatur jährlich – oft nach einer Routinewartung durch den Hersteller – auf „Herz und Nieren“ überprüft. Auch dieser Aufwand – bzw. GMP-Forderung – ist zu vertreten oder de facto hinzunehmen.

Ursachen für eine Veränderung der Fläche

Bei Routineuntersuchungen wird nach einer genau festgelegten Vorschrift gearbeitet. Wenn (!) von ausgereiften und validierten Methoden ausgegangen werden kann, ist neben der Verschiebung der Retentionszeit und einer veränderten Peakform das häufigste Problem eine veränderte Fläche. Die Erfahrung zeigt, dass die wichtigsten Ursachen der Flächenänderung folgende sind:

- Änderung des Flusses
- Änderung der Injektionsmenge/Konzentration (Dazu gehören auch: Irreversible Adsorption an der Nadel, Verdampfen der Probenlösungsmittels)
- Änderung des pH-Wertes (nur im Falle einer pH-Wert-Abhängigkeit der UV-Absorption)
- Veränderung am Detektor

Die ersten beiden Ursachen sind durch den beschriebenen Test feststellbar, die Überprüfung des pH-Wertes ist schnell durchzuführen. Aufwendiger ist die Überprüfung des Detektors, s. Tabelle 1.

Überprüfung der Messpräzision

Steht man vor einer neuen Aufgabe oder es wird mit einer neuen bzw. geänderten Apparatur gearbeitet, ist die sechsfache Injektion einer Standardlösung der geeignete Schritt zur Überprüfung der Messpräzision. Dieser Test deckt auch manchen Fehler auf. s. Tabelle 2.

Injektor-, Pumpen- und System- oder Messpräzision

stochastisch unabhängige Prozesse

In der Chromatographie haben wir mit so genannten stochastisch unabhängigen Prozessen zu tun. Das sind Prozesse, bei denen der Fehler eines Teilschrittes unabhängig vom Fehler davor oder danach ist. In diesem Fall können durch Wiederholmessungen der Mittelwert, x , und die Standardabweichung, σ , eines Teilschrittes errechnet und die Varianzen, σ^2 , gebildet werden. Die Varianzen werden addiert und durch Wurzelziehen der Summe kann die Gesamtstandardabweichung des Prozesses/ der Methode ermittelt werden. So in einer HPLC-Apparatur:

Bestimmung Mittelwert

Gesamt-standard-abweichung

$$s^2 = \frac{s^2_{\text{Gesamt}} + s^2_{\text{Pumpe}} + s^2_{\text{Injektion}} + s^2_{\text{Säule}} + s^2_{\text{Detektor}} + s^2_{\text{Kapillaren}} + s^2_{\text{Auswertung}}}{7}$$

Gesamt-präzision	Zur Ermittlung der Gesamtpräzision wird ein Testgemisch benötigt. Wenn man folgende, chromatographische Bedingungen wählt, erhält man vier, sehr gut voneinander getrennte, symmetrische Peaks.
Bedingungen	<p>Eluent: Methanol</p> <p>Säule: RP 18</p> <p>Fluss: 1ml/min</p> <p>Testgemisch: Nitromethan Anthracen Pyren Perylen</p> <p>Detektion: UV (254 nm)</p>
Verifizierung	= Prüfung der HPLC typische Forderungen. Beispiele: <ul style="list-style-type: none"> • Erreicht der Detektor mit MeOH bei 1 ml/min und 254 nm ein für die HPLC übliches Basislinienrauschen von 0,04 mAU? • Ist die Systempräzision gemessen mit MeOH und einem geeigneten Testgemisch kleiner 1%?
Validierung	= Eignung der HPLC für ein bestimmtes Trennproblem Beispiele: <ul style="list-style-type: none"> • Zuckeranalytik mit Ionenaustauscher Wird mit Wasser (eine andere Viskosität als der für diverse Tests übliche Eluent MeOH!) und realen Zuckerproben die von mir geforderte Präzision von 1,8 % erreicht? • Trennung von Phosphorlipiden Welche Nachweisgrenze erreiche ich bei 200 nm mit einer Diolphase und organischen Eluenten? Zusammenfassend wäre folgendes festzuhalten:
Verifizierung	Bei der Verifizierung wird die Anlage auf die vom Hersteller angegebene bzw. von der „HPLC-Gemeinschaft“ erwarteten Spezifikationen geprüft, d. h. Überprüfung einer allgemein formulierten Qualitätsforderung.
Qualifizierung	Bei der Qualifizierung geht es um die Überprüfung technischer Werte, letzten Endes Ablesen von Widerständen und Spannungswerten der „trockenen“ Anlage.

Bei der **Validierung** liegt der Schwerpunkt auf der Frage: Ist meine Trennung mit dieser Apparatur zu den von mir (Kunde, Behörde etc.) festgelegten/erwarteten Qualitätsmerkmalen zu erreichen, d. h. hier handelt es sich um eine **anwendungsbezogene** Prüfung.

Der Einfachheit halber wird in diesem Dokument von der Überprüfung der Apparatur und von Gerätetests die Rede sein. Nach obiger Nomenklatur würden diese Tests in den Bereich der **Verifizierung** fallen.

Gerätetests in Routine und Forschung

Häufigkeit von Gerätetests Es existiert weder ein behördlicher noch ein anderweitiger offizieller Hinweis über Häufigkeit und Durchführungsmodus von Gerätetests. Lediglich Empfehlungen von Gremien, Verbänden usw. Somit sollten aus ökonomischen Gründen Gerätetests nur bei Bedarf und mit Maß durchgeführt werden. Es ist sinnvoll zwischen Routineuntersuchungen und Messungen von unbekannten Proben, mit wenigen oder gar keinen Informationen, zu unterscheiden.

Routine/Forschung

Kriterien in Routine und Forschung In der Routine geht es generell um Serienmessungen mit mehr oder weniger bekannten Proben z. B. Gehaltsbestimmung, Freigaben. Hier gelten strengere Kriterien für die Apparatur als in Forschungsbereichen mit den oft einmaligen Fragestellungen. So ist z. B. dort eine Systempräzision von 2 % oder 3 % durchaus ausreichend.

Routine

Kontrollchromatogramm Das sicherste Kontrollinstrument in der Routine-HPLC ist das Kontrollchromatogramm. Ergibt die Doppelinjektion einer Standardlösung des erwartete Chromatogramm (im Rahmen der Methodenvalidierung ermittelte bzw. nach einem festgestellten einwandfreien Zustand der Apparatur aufgenommenen Chromatogramm), so wäre eigentlich keine weitere Überprüfung notwendig. Ist das nicht der Fall, so ist wohl der nächste einfache Schritt der Blick auf die Diagnosewerte der Apparatur: Lampenenergie, Druck etc.

Ausschluss von Fehlern Gibt diese schnelle Überprüfung keinen Aufschluss über mögliche Fehler, so wäre die sechsfache Injektion einer Testlösung, s. o., zur Lokalisierung des Fehlers angebracht. Erst danach schließt sich eine doch aufwendigere, systematische Fehlersuche an. Abb. 1 gibt ein vereinfachtes Schema zur Vorgehensweise wieder.

In einigen Bereichen wie Pharma hat es sich eingebürgert, dass vor einer Messserie der Standard automatisch 5 oder 6 Mal injiziert wird, um aktuelle Werte zur Systempräzision zu erhalten. Da in der Routine Probengeber eingesetzt werden und dieser Test „nebenbei“ laufen kann, wird dieser Aufwand unreflektiert akzeptiert.

Tabelle 2

Messpräzision unter Wiederholbedingungen

Symptom	mögliche Ursachen
zunehmende Peakflächen	Säulensättigungseffekte, d. h. irreversible Sorption an der stationären Phase
abnehmende Peakflächen Drift der Retentionszeiten	<ul style="list-style-type: none">• Zersetzung der Kalibrierlösung• Chromatographisches Gleichgewicht noch nicht erreicht:<ul style="list-style-type: none">Δ EluentΔ SäuleΔ Temperatur
Starke Streuung der Peakflächen	<ul style="list-style-type: none">• Luftblase im Injektor• variierendes Injektionsvolumen• Kurzzeitschwankungen der Pumpe• Viskose Probenlösung
Starke Streuung der Retentionszeiten	<ul style="list-style-type: none">• Langzeitschwankungen der Pumpe• Nicht robuster Eluent<ul style="list-style-type: none">z. B. – pH-Wert-Änderung durch falschen Puffer<ul style="list-style-type: none">- unbeabsichtigter Salzgradient

Fazit

Unabhängig von Art und Ziel der HPLC-Analytik (Identitätstests, Gehaltsbestimmung, Spurenmethode, Methodenentwicklung), gehört das Wissen um die Güte der verwendeten Apparatur zum guten Laborton. Häufigkeit und Tiefe hängen vom beabsichtigten Trennproblem ab. Geeignete Tests helfen, darüber Auskunft zu erhalten – unabhängig von der Säule. Die Eignung des chromatographischen Milieus für eine bestimmte Trennung (Säule, Eluent, Temperatur etc.) ist eine individuelle Frage und sollte getrennt von reinen Gerätetests betrachtet werden. Zur Häufigkeit von Gerätetests gilt generell folgende Prämissen: Häufige Überprüfung weniger, jedoch relevanter Größen mit geringem Aufwand bringt mehr Sicherheit, als häufige Prüfung aller Komponenten mit einem fraglichen Aufwand/Nutzen-Effekt.

Abb. 1 Schema zur Überprüfung einer HPLC Anlage

Bei diesem Schema wird vorausgesetzt, dass die Säule equilibriert ist, eine konstante Temperatur herrscht und der Detektor ok ist.

Bei einer isokratischen Anlage:	1. Schritt Injektion des Eluenten oder des Probenlösungsmittels
Bei einem Gradienten:	Blindgradient

Erwartetes Ergebnis:

Keine Peaks,
ansonsten: Spülen

2. Schritt

2-fache Injektion eines Standards

Schnellentscheidung:

Ist die Peakhöhe gleich der Peakhöhe aus dem Kontrollchromatogramm, dann ist der Injektor in Ordnung.

Ist die Peakfläche gleich der Peakfläche aus dem Kontrollchromatogramm, dann sind Injektor und Pumpe in Ordnung.

- Fall 1: - Peakform und Auflösung in Ordnung
 - $t_R = \text{const}$
 - $\text{Fläche}_{\text{St}} = \text{Fläche}_{\text{Kontroll}}$

Alles in Ordnung, keine weitere Aktion notwendig
(Es muss vorher festgelegt werden, welche Abweichungen noch zulässig sind)

- Fall 2: Problem: Veränderung von t_R und der Peakform

Gründe hierfür können eine Veränderung des Flusses, der Säulenpackung, des pH-Wertes usw. sein. Eine gründliche Fehlersuche ist nötig. Bleibt die Totzeit konstant, ist der Fluss in Ordnung

- Fall 3: Problem: Peakform und Auflösung in Ordnung, $t_R = \text{const}$, aber $\text{Fläche}_{\text{St}} \neq \text{Fläche}_{\text{Kontroll}}$,
Zur näheren Ortung des Fehlers Durchführung von Schritt 3.

3 .Schrift

6-fache Injektion einer Testlösung

- Fall 1: $\text{Fläche}_{\text{aktuell}} \neq \text{Fläche}_{\text{Kontroll}}$, aber die Differenz ist konstant
($V_{\text{K, Fläche}} \leq 0,5 - 0,8 \%$)

Gründe:

1. Beim Detektor: Luftblase?

Wellenlängenverschiebung?
Lampe in Ordnung?
Zelle verschmutzt?
Ausgangsspannung in Ordnung?

2. pH-Wert verschoben, aber konstant
3. Leckage nach Detektor

Fall 2: stärkere Schwankungen der Peakfläche ($V_{K, Fläche} \geq 0,8 - 1\%$)

Gründe:

1. Pumpe und Injektor in Ordnung?
 - Permanente Luftblasen → (besser) entgasen
 - ständige Änderung des pH-Wertes → Verwendung eines robusteren Puffers?
 - Luftblasen in der Detektorzelle
 - Wellenlängenverschiebung, Messung an einer UV-Flanke
2. Pumpe oder Injektor defekt?
Reparatur oder reinigen der Geräte

Wichtige Begriffe für die Pumpe

Arbeitet die Pumpe richtig, präzise oder genau?

**Richtigkeit,
Präzision
Genauigkeit**

Hier geht es nicht um Haarspaltereien und diese Frage ist auch nicht als netter „Gag“ gedacht. Erst das Wissen um Genauigkeit, Richtigkeit und vor allem um Präzision einer Pumpe gibt Gewissheit über die Aussagekraft eines quantitativen Ergebnisses. Was bedeutet nun präzise und richtig in diesem Zusammenhang und wie werden diese Kenndaten ermittelt?

Die Kenndaten werden durch einen Test bestimmt.

Pumpentest

Der Pumpentest besteht aus drei Teilen.

Richtigkeit

1. Pumpenrichtigkeit

Mittels einer Stoppuhr und eines Messzylinders wird die Richtigkeit der Volumenförderung überprüft (Messung am besten nach der Säule): Die Frage ist, fördert die Pumpe z. B. die gewünschten 1 ml/min oder sind es aktuell vielleicht nur 0,95 ml/min?

Dabei ist ein relativer Fehler von < 5% akzeptabel.

**Präzision
(Konstanz)**

2. Pumpenpräzision oder Pumpenkonstanz (Maß für die Streuung).

Es wird zwischen Langzeit- und Kurzzeitkonstanz unterschieden.

Langzeit-konstanz a) Langzeitkonstanz
Ein Maß dafür ist die Präzision der Retentionszeiten: Wie ist der Variationskoeffizient V_{KL} der Retentionszeiten bei der 6-fachen Injektion einer Komponente, d. h., wie ist die Streuung der Flussrate über einen längeren Zeitraum? Bei geringer Präzision der Retentionszeiten besteht die Gefahr der Peakverwechselung – vor allem bei vielen kleinen Peaks.

Kurzzeit-konstanz b) Kurzzeitkonstanz
Sie beschreibt die Flusskonstanz während der Elution eines Peaks. Sie ist zu ermitteln über den Variationskoeffizienten, V_{KK} der Peakfläche bei der 6-fachen Injektion eines Komponenten.

Erläuterung

Abhängigkeiten der Peakfläche Die Fläche ist proportional der injizierten Menge. Bei einer Flussänderung ändert sich aber die Verweildauer der Komponente in der Zelle: Bei einem kleinen Fluss ist die Verweildauer länger, bei höherem Fluss ist sie kürzer. Das bedeutet, dass im zweiten Fall die Substanz für eine kürzere Zeit UV-Licht absorbiert, die Fläche wird kleiner. Weil aber die injizierte Menge als solche konstant ist, muss das Produkt aus Fluss x Fläche auch eine Konstante sein:

$$m = F \times A = \text{const.};$$

wenn F abnimmt muss A zunehmen!

Ändert sich die Fläche, so haben wir den Beweis, dass eine Pumpenkurzzeitkonstanz nicht gegeben ist. Bei einem V_K z. B. von 1 % bedeutet das, dass das Ergebnis mit einem Fehler von mindestens 1 % behaftet ist, wenn man über die Fläche auswertet.

Die Voraussetzungen für die oben gemachten Aussagen sind:

- stabile Lösungen,
- reversible Wechselwirkungen,
- konstantes Injektionsvolumen,
- konstanter pH-Wert
- keine Messung an einer UV-Flanke.

Genauer Fluss Ist nun der Fluss richtig und präzise, so sprechen wir von einem genauen Fluss. Genauigkeit ist also der Oberbegriff von Richtigkeit und Präzision, wird allerdings in der Literatur oft der „Präzision“ gleichgesetzt.

Noch ein Hinweis:

Beeinflussung der Peakhöhe In der HPLC werden konzentrationsempfindliche Detektoren eingesetzt. Bei kleinen Flussschwankungen bleibt die Konzentration praktisch konstant und damit wird auch die Signalhöhe kaum beeinflusst. Diese ändert sich natürlich, genau wie die Fläche, wenn

die injizierte Menge sich ändert. Diese Tatsache erlaubt folgende schnelle Entscheidung:

Schnellentscheidungen	Bleibt bei einer mehrfachen Injektion die Peakhöhe konstant? Dann kann man daraus schließen, dass das Injektionssystem in Ordnung ist.
	Bleibt bei einer mehrfachen Injektion die Peakhöhe und die Peakfläche konstant? Dann sind das Injektionssystem und die Pumpe in Ordnung.

Das Fazit

Auswertung über die Fläche oder über die Höhe	Wenn über die Fläche ausgewertet wird, ist die Überprüfung der Kurzzeitkonstanz der Pumpe wichtiger, als die Überprüfung der Richtigkeit des Flusses. Ist die Kurzzeitkonstanz nicht gegeben, so ist eine Auswertung über die Höhe, der über die Fläche vorzuziehen.
--	---

Literatur

- (1) L. Huber, *Validierung computergesteuerter Analysesysteme*, Springer Verlag, Berlin 1996
- (2) R. Mertens, S. Kromidas, R. Klinker, *Validierung von Rechnersystemen aus Anwendersicht in einem analytischen Labor*, GIT, Fachzeitschrift für das Laboratorium 12, 1995
- (3) B. Weigand, Schering AG Berlin, persönliche Mitteilung
- (4) S. Kromidas, *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- (5) V. Meyer, *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern*, Hüthig Verlag, Heidelberg, 1996
- (6) H. Godel, A. Kohn, *Automatische Leistungsverifizierung und Betriebsqualifizierung von HPLC-Systemen*, GIT Spezial Chromatographie 1/96
- (7) S. Kromidas, *HPLC-Tipps*, Hoppenstedt Verlag, Darmstadt
- (8) G. Maldener, *System suitability test*, *Chromatographia*, Vol. 28, No 1/2, 1989
- (9) S. Kromidas und H.-J. Kuss (Hrsg), *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim