

# Überprüfung der Robustheit einer HPLC-Methode

**Bemerkung: Diese Tabelle gilt als Beispiel einer Maximalforderung;  
Die Auswahl der zu überprüfenden Parameter ist stark Methoden-  
abhängig und individuell zu treffen!**

## **Probenvorbereitung, Eluentenvorbereitung**

**Extraktionszeit, Ultraschallzeit (und mehr...), Dauer und Art des Auflöserns der Probe (Schüttelautomat bzw. manuell), Peakfläche und -form abhängig von der Konstitution und dem pH-Wert der Probenlösung, Substanzverlust abhängig vom Filtermaterial, Glasbeschaffenheit, Rührer, Wägehütchen, Inhomogenität der Probe (Matrix-Einfluss, Beschichtung Lack usw.), Lichtempfindlichkeit**

## **Verschleppung, Sonstiges**

**Einfluss der Septen (Material, Aufbau), des Materials der Injektionsnadel, der Purgeflüssigkeit, der Kapillaren auf Verschleppung/Memoryeffekte; Fläche(n) mit und ohne Säule vergleichen (irreversible Sorption?), Probenlösung mit/ohne Placebo/Matrix injizieren (Geisterpeaks?)**

# Überprüfung der Robustheit einer HPLC-Methode

**Flussrate:**  $\pm 1-2\%$  und Einfluss auf Peakhöhe, -fläche –form und Retentionszeit testen (Unterschied Isokrat/Gradient!)

**Gradient:** Verweilvolumen, Design und Volumen der Mischkammer, Mischungsqualität ist abhängig a) von der Viskosität der Eluenten A und B, b) von der Steilheit, Verbesserung der Basislinie etc. falls vorgemischt wird (wichtig!)?

**Eluent:**

- Normal-Phase:  $\pm 20-30$  ppm H<sub>2</sub>O im Eluenten
- RP: 1-2% organischer Anteil absolut, z. B. bei einem 60/40 Wasser / Acetonitril-Eluenten 61/39 und 59/41 testen.
- ionische Komponenten:  $\pm 0,1$  pH-Wert,  $\pm 5$  mmol Puffer bzw.  $\pm 5\%$  Ionenpaarreagenz/sonstige Modifier

**Temperatur:**  $\pm 1^\circ\text{C}$  – aber auch: Nur „links“ oder auch „rechts“ eingestellt? Einfluss der Geometrie/des Prinzips (Umluft/Aluminiumblock)?

# Überprüfung der Robustheit einer HPLC-Methode

- Säule:** Charge, Lieferant des gleichen Materials, Art des „Einfahrens“ bei neuen/gebrauchten Säulen (mit was, Volumen?), Säulenstabilität
- Detektion:** Beispiel UV:  $\lambda \pm 2$  nm, Zeitkonstante  $\pm 0,1$  sec, Bandbreite („Bandwidth“) Spaltbreite („Slit“) und Referenzwellenlänge beim Dioden-Array (1)
- Datenauswertung:** Datenrateaufnahme („Sample Rate“)  $\pm 2 - 4$  Daten/sec, Threshold-Wert, manuelle/automatische Integration (1)

(1): Einfluss auf den Wert selbst – z. B. Peakfläche – aber auch auf den VK – relevant vor allem bei frühen, schmalen, kleinen Peaks!