



|¹

1 Grundsätzliches zur Optimierung

HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker. Herausgegeben von Stavros Kromidas
Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 3-527-31470-9





1.1 Grundsätze der Optimierung in der HPLC am Beispiel der RP-Chromatographie

Stavros Kromidas

Zunächst werden einige Fragen diskutiert, die sinnvollerweise zu Beginn einer Methodenentwicklung zu klären sind. Anschließend wenden wir uns den prinzipiellen Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung in der HPLC zu. Es folgt eine Diskussion über Effizienz und Abfolge der einzelnen Maßnahmen für den isokratischen und den Gradienten-Modus. Ein Schwerpunktthema der Ausführungen bilden Strategien und Konzepte zur Methodenentwicklung und Überprüfung der Peakhomogenität. Schließlich werden Wege zur Verfolgung weiterer Ziele als „besser trennen“ aufgezeigt: „schneller trennen“, „empfindlicher messen“, „Geld sparen“. Das Kapitel wird mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick beendet.

1.1.1

Vor den ersten Optimierungsschritten

Es ist aus Gründen der Ökonomie sinnvoll, sich zu Beginn einer Methodenentwicklung/Trennungsoptimierung als erste Aktion mit folgenden Fragen zu befassen:

- *Was will ich?* Also: Was ist das eigentliche Ziel meiner Trennung?
- *Was habe ich?* Also: Über welche analytisch relevante Informationen bzgl. der Probe verfüge ich?
- *Wie mache ich es?* Also: Steht das, was ich bräuchte, zur Verfügung und ist das, was ich vorhabe, auch tatsächlich realisierbar?

Auch wenn auf den ersten Blick diese Fragen etwas (zu) theoretisch oder gar abgehoben erscheinen mögen, halte ich es für notwendig, zu Beginn eines Projekts die analytische Fragestellung und die realistischen Möglichkeiten zu deren Bewältigung bewusst wahrzunehmen. Ein frühes Gespräch mit meinem Chef, meinem Kollegen, meinem Kunden oder zur Not mit mir selbst kann späteren Ärger, Zeitvergeudung und letztendlich Kosten ersparen. Diese Zeit kann als eine sichere Investition angesehen werden.

Zur ersten Frage: Was will ich?

Wenn irgend möglich, sollten vor dem Start folgende oder ähnliche Fragen beantwortet werden:

- Brauche ich eine Methode, um *diesen* hochtoxischen Metaboliten auf jeden Fall zu quantifizieren, oder verfolge ich das Ziel, dass die Behörde meine Methode akzeptiert?

HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker. Herausgegeben von Stavros Kromidas
Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 3-527-31470-9

4 | 1 Grundsätzliches zur Optimierung

- Was ist im vorliegenden Fall wichtig: Schnelle Analysenzeiten, langlebige Säulen, robuste Bedingungen, oder steht im Vordergrund eine höchstmögliche Spezifität ohne Wenn und Aber?
- Warum darf der VK (VK: Variationskoeffizient) höchstens 2 % betragen? Um wie viel schlechter wird unser Produkt, wenn sich ein VK von 2,5 % ergeben würde? Gehen die Analysenkosten tatsächlich mit der Qualität des Produkts einher?

Es handelt sich, vereinfacht formuliert, um folgende Frage: Geht es im konkreten Fall um die Erfüllung von Anforderungen, oder geht es tatsächlich um „Wahrheit“, d. h., stehen formale Aspekte oder die analytische Fragestellung im Vordergrund? Diese Frage sollte wegen möglicher Konsequenzen bewusst und ehrlich beantwortet werden. Wie schwer es in unserer Zeit ist, zu sinnvollen und durchdachten Entscheidungen zu stehen, ohne als Exot oder gar als Querulant zu gelten, wurde an anderer Stelle beschrieben [1].

Wenn (!) das Umfeld es ermöglicht, sollte man sich darin üben, alles zu hinterfragen. Unkonventionelle Fragen führen häufig zu einfachen, vernünftigen Lösungswegen.

Zur zweiten Frage: Was habe ich?

Informationen über die Probe erleichtern die Entwicklung eines geeigneten Methodendesigns, z. B.:

- Was steht im Bericht der Kollegen aus der chemischen Entwicklung über Lichtempfindlichkeit und Sorptionsverhalten des neuen Wirkstoffs gegenüber Glasoberflächen? Kann ich schnell dort anrufen? Das heißt, komme ich mit einem vertretbaren Aufwand an relevante Informationen heran?
- Stehen in der internen Datenbank (die bedauerlicherweise selten gepflegt und noch seltener in Anspruch genommen wird) nicht doch Informationen über ähnliche Trennungen aus der Vergangenheit, die seinerzeit nicht weiterverfolgt wurden?
- Ich kann doch schnell über die bekannte Struktur der Hauptkomponente ihren pK_s -Wert ausrechnen und so beim geeigneten pH-Wert die ersten Versuche starten (s. Kap. 1.4). Die entsprechende Software hatten wir doch vor kurzem gekauft, oder wie war es? Wie sind die Erfahrungen des Kollegen Miller aus der Nachbarabteilung, der früher mit ähnlichen Substanzen zu tun hatte?

Wenn die Widerstände nicht allzu groß sind, sollte man das Mittel der Kommunikation und des Austauschs nutzen – wenn es sein muss, ohne darüber zu sprechen.

Zur dritten Frage: Wie mache ich es?

Man sollte die Machbarkeit eines Vorhabens unbedingt realistisch abschätzen, mögen sonstige Fakten und Argumente objektiv auch noch so „richtig“ sein, z. B.:

- Kann ich meinen Abteilungsleiter davon überzeugen, dass es aus Gesamtfirmensicht sinnvoll wäre, im Vorfeld (!) mit den späteren Routineanwendern

über Methodendesign und weitere Details der Methode zu sprechen? Wenn allerdings Angst um Know-How-Verlust oder Budgetfragen oder sonstige psychosoziale Barrieren ein Gespräch mit den „anderen“ de facto unmöglich machen, ist dies eine bittere, aber eine zu akzeptierende Realität. Oder: Ist es sinnvoll, um eine Änderung folgender allgemein bekannter und akzeptierter Situation zu kämpfen?: Ein Termin ist vorgegeben, also ist die Validierung in zwei Wochen durchzuziehen. Die späteren (immensen) Folgekosten durch Wiederholmessungen, Reklamationen usw., die unweigerlich dadurch entstehen, dass kaum eine analytische Methode unter realen Bedingungen in zwei Wochen zu validieren ist, belasten ja nicht „uns“, sondern die Qualitätskontrolle. Als Prüfkosten gehen sie unter und werden mangels nüchterner, ganzheitlicher Betrachtung sowieso seit Jahrzehnten in Kauf genommen. Die Konsequenzen, oder positiv formuliert, das Verbesserungspotenzial möge der Leser sich selbst ausmalen.

- Ist es bei der Entwicklung einer späteren Routinemethode, die weltweit eingesetzt werden soll, wirklich sinnvoll, sich unbedingt für eine polare RP-Phase ob ihrer häufig besseren Selektivität zu entscheiden, wo doch aller Voraussicht nach Probleme mit der Chargenreproduzierbarkeit zu erwarten sind? Ist möglicherweise eine hydrophobe, robustere Säule mit einer geringeren, aber durchaus ausreichenden Selektivität die bessere Alternative?
- Ist es sinnvoll, mein analytisches „Können“ unter Beweis zu stellen, indem ich den VK einer Methode, die später in diversen Betriebslabors eingesetzt werden soll, auf 0,7 % trimme?

Realitäten – und Meinungen sind auch Realitäten –, die über Erfolg und Misserfolg der analytischen Tätigkeit mitbestimmen, sollten, wenn irgend möglich, in das Methodendesign einfließen. So hilft es, wenn die Anzahl von Meetings zugunsten von „Kaffee-Runden“ und „Zusammen essen gehen“ herabgesetzt werden würde. Es gilt, die Kommunikation zu Lasten eines – in einer bestimmten Umgebung obligatorischen und erwarteten – „gekonnten“ Austauschs von Argumenten, „sich einbringen zu müssen“-Mentalität sowie der Darstellung von ohnehin bekannten Ansichten zu erhöhen.

Zusammenfassend wären für eine erfolgreiche Methodenentwicklung folgende zwei Grundvoraussetzungen zu nennen:

1. Fachliche Kompetenz ist vorhanden bzw. sie kann „ausgeliehen“ oder „eingekauft“ werden.
2. Die analytischen Möglichkeiten passen zu den Anforderungen, und man kann darüber sprechen.

Klares Definieren von Vorgaben, unmissverständlich formulierte, für alle Beteiligten nachvollziehbare Ziele, kurze Informationswege und kritisches Abschätzen von Möglichkeiten/Risiken sind meines Erachtens (nicht nur) in der Analytik wichtiger als das Erreichen von „Spitzen“-Werten, wie niedrige Nachweisgrenzen, Korrelationskoeffizienten um 0,999, VKs kleiner 1 % oder um 30 % günstigere Geräte.

6 | 1 Grundsätzliches zur Optimierung

1.1.2

Was heißt eigentlich „Optimierung“?

Bei den Bemühungen um Optimierung einer Trennung werden grundsätzlich folgende Ziele avisiert:

- besser trennen (bessere Auflösung),
- schneller trennen (kürzere Retentionszeit),
- „mehr“ sehen (niedrigere Nachweisgrenze),
- billiger trennen (Ökonomie anstreben),
- mehr trennen (größerer Durchsatz).

Die drei erstgenannten Ziele dürften die wichtigsten sein, und von diesen wiederum liegt die Verbesserung der Auflösung wahrscheinlich an erster Stelle. Wir werden uns daher zunächst und ausführlicher mit diesem Punkt beschäftigen, bevor wir uns den anderen Aspekten widmen. Die präparative HPLC ist nicht Gegenstand dieses Buches.

Vorbemerkungen

Die Theorie der Chromatographie gilt prinzipiell für alle chromatographischen Techniken. Demzufolge werden im Grundsatz stets die gleichen Optimierungsprinzipien verfolgt. Es liegt allerdings auf der Hand, dass die Prioritäten und die Gewichtung der einzelnen Maßnahmen beispielsweise in der GPC und in der μ -LC-MS(MS) doch recht unterschiedlich ausfallen. Nachfolgend werden Optimierungsmöglichkeiten aufgezeigt sowie in kompakter Form Vorschläge für die populärste der flüssigchromatographischen Techniken, der RP-HPLC, gemacht. Die Charakteristika in den anderen Modi werden in Kap. 2.1 bis 2.7 behandelt.

Die chromatographischen Regeln und die Theorie der HPLC werden als bekannt vorausgesetzt und hier nicht ausführlich behandelt; bei Bedarf werden einige Begriffe kurz wiederholt.

Nachfolgende Ausführungen gelten für isokratische Trennungen.

1.1.3

Verbesserung der Auflösung („besser trennen“)

Auflösung („resolution“, R) ist, vereinfacht ausgedrückt, der Abstand zweier benachbarter Peaks an der Peakbasis. Das ist also das, was jeder Praktiker bei der Verbesserung einer Trennung im Alltag im Visier hat, nämlich diesen Abstand zu vergrößern.

Die entsprechende Gleichung lautet:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1}$$

N : Bodenzahl, sie ist ein Maß für die Trennleistung bzw. Säuleneffizienz. Die Bodenzahl ist letzten Endes ein Maß für die Verbreiterung der Substanzzone aufgrund von Diffusionsvorgängen. Hier geht es also um die Frage: Befinden

sich die Analytmoleküle, die den Detektor erreichen, in einem kleinen oder in einem großen (Peak-)Volumen, d. h., erhalte ich schmale oder breite Peaks?

Genau genommen sollte man zwischen der theoretischen und der effektiven Bodenzahl unterscheiden. Die theoretische Bodenzahl ist die Bodenzahl einer inerten Komponente (s. unten) und damit eine charakteristische Größe, eine Konstante, für eine Säule bei definierten Bedingungen. Die effektive Bodenzahl ist die Bodenzahl einer bestimmten retardierten Komponente; in ihre Berechnung geht ihr Retentionsfaktor ein (s. unten). Heute wird allerdings dieser Unterschied nicht immer gemacht, die Rede ist lediglich von „der“ Bodenzahl. In den meisten Fällen wird die theoretische Bodenzahl berechnet – allerdings von retardierten Substanzen. In diesem Zusammenhang sollte man sich im Klaren darüber sein, dass die Bodenzahl von vielen Faktoren abhängig ist. Dies sind z. B. Injektionsvolumen, Temperatur, Eluentenzusammensetzung, Fluss, Retentionszeit, Analyt und nicht zuletzt die Berechnungsformel: Peakbreite an der Peakbasis, bei 10 % oder bei 50 % Peakhöhe? Daher kann ein Vergleich von Bodenzahlen aus der Literatur problematisch sein.

α : *Trennfaktor*, früher: Selektivitätsfaktor. α ist ein Maß für die Trennfähigkeit eines chromatographischen Systems für zwei bestimmte Komponenten. (Chromatographisches System: die aktuelle Kombination aus stationärer Phase, mobiler Phase, Temperatur.) Der α -Wert ist der Quotient aus den zwei Netto-Retentionszeiten, also der Quotient der Aufenthaltszeit der zwei Komponenten an der stationären Phase. Es geht hier um die Frage: Ist *dieses* chromatographische System in der Lage, zwei bestimmte Substanzen zu unterscheiden? Das heißt, ist es selektiv für diese zwei Substanzen, kann ich sie prinzipiell trennen? Selektivität ist, vereinfacht ausgedrückt, der Abstand zwischen zwei Peaks von Peakspitze zu Peakspitze. Der Unterschied zur Auflösung besteht darin, dass bei der Selektivität die Peakform (also die Bodenzahl) nicht berücksichtigt wird. Denke: α ist lediglich der Quotient aus zwei (Retentions-)Zeiten. Der Trennfaktor ist nur von der „Chemie“ abhängig (s. unten: Retentionsfaktor).

k : *Retentionsfaktor*, früher: Kapazitätsfaktor k' . k ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung einer gegebenen Substanz in einem gegebenen chromatographischen System (chromatographisches System, s. oben.) Das heißt, um wie viel länger bleibt meine Substanz bei diesen Bedingungen an der stationären Phase im Vergleich zu der mobilen Phase? Der k -Wert ist ein Index (genauso wie der α -Wert) und unabhängig von apparativen Gegebenheiten wie Säulendimensionen und Fluss. Der k -Wert ändert sich nur, wenn Parameter verändert werden, die etwas mit Wechselwirkung zu tun haben, also mit der „Chemie“: stationäre Phase, mobile Phase, Temperatur. Solange diese Parameter konstant bleiben, bleibt der k -Wert konstant, unabhängig z. B. davon, wie hoch der Fluss ist und ob ich eine 10 oder eine 15 cm Säule verwende.

Obschon die Totzeit in der Formel für die Auflösung nicht explizit auftaucht, ist diese Kenngröße für die folgenden Ausführungen hilfreich. Daher sei kurz auch auf diesen Begriff eingegangen.

t_m oder t_0 : Totzeit, Lösungsmittelpeak, Durchbruchzeit, Front, „Luftpeak“. Das ist die Aufenthaltszeit einer inerten Komponente in der HPLC-Anlage. Als inert wird eine Komponente bezeichnet, die sterisch ungehindert überall „hinkommt“, selbstverständlich auch in die Poren der stationären Phase, aber dort nicht festgehalten wird. Anders formuliert: Die Totzeit ist die Aufenthaltszeit einer jeden nicht ausgeschlossenen Komponenten in der mobilen Phase, auch in der stehenden mobilen Phase (d. h. innerhalb der Poren). Aber noch einmal: Es findet „keine“ Wechselwirkung mit der stationären Phase statt. Die Totzeit ändert sich demnach nur, wenn etwas „Physikalisches“, „Mechanisches“ passiert, z. B. Änderung der Länge/des Innendurchmessers der Säule, der Packungsdichte (Menge an stationärer Phase in der Säule) oder des Flusses. Die Totzeit, also die Aufenthaltszeit einer nicht ausgeschlossenen Komponente in der mobilen Phase, ist eine stoffunspezifische Zeit: Alle Komponenten wandern im Eluenten gleich schnell, die Aufenthaltszeit der Komponenten im Eluenten stellt keinen Beitrag zur Trennung dar. Eine Trennung ist nur möglich, wenn sich die Substanzen unterschiedlich lang an/in der stationären Phase aufhalten.

Die Auflösung R , der Abstand von Peakbasis zu Peakbasis, hängt ausschließlich von folgenden drei Faktoren ab:

- wie stark die Wechselwirkung der Substanz mit der stationären Phase ist (eluiert der Peak „früh“ oder „spät“), d. h. vom k -Wert;
- wie die Unterscheidungsfähigkeit des chromatographischen Systems für zwei mich interessierende Komponenten ist, d. h. vom α -Wert;
- und natürlich auch, ob die betreffenden Peaks schmal oder breit sind, d. h. von der Bodenzahl.

Die Konsequenz lautet: Wenn ich die Auflösung verbessern möchte, stehen mir prinzipiell nur (!) folgende drei Möglichkeiten zur Verfügung:

- generelle Erhöhung der Wechselwirkung (k -Wert nimmt zu),
- eine stoffspezifische Veränderung der Wechselwirkung (α -Wert nimmt zu), oder
- eine Erhöhung der Trennleistung (Bodenzahl nimmt zu).

1.1.3.1 Prinzipielle Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung

Das oben Geschilderte soll auf ein fiktives Beispiel angewandt werden (Abb. 1). Gehen wir von einer aktuell mangelnden Auflösung aus (Abb. 1, oberes Chromatogramm): Welche prinzipiellen Möglichkeiten haben wir, die Auflösung zu verbessern?

Bemerkung: Die Totzeit ändert sich nur bei Möglichkeit 1 („ t_m “ \uparrow).

Möglichkeit 1: Ich Sorge dafür, dass alle Komponenten, einschließlich einer inerten Komponente (s. oben: Zunahme der Totzeit), später eluieren. Da nun auch die Totzeit zunimmt, kann hier nur etwas „Physikalisches“ vorgelegen haben: längere Säule, größerer Innendurchmesser (in der Praxis: breitere Peaks, also unbrauchbar), Verringerung der Flussrate.

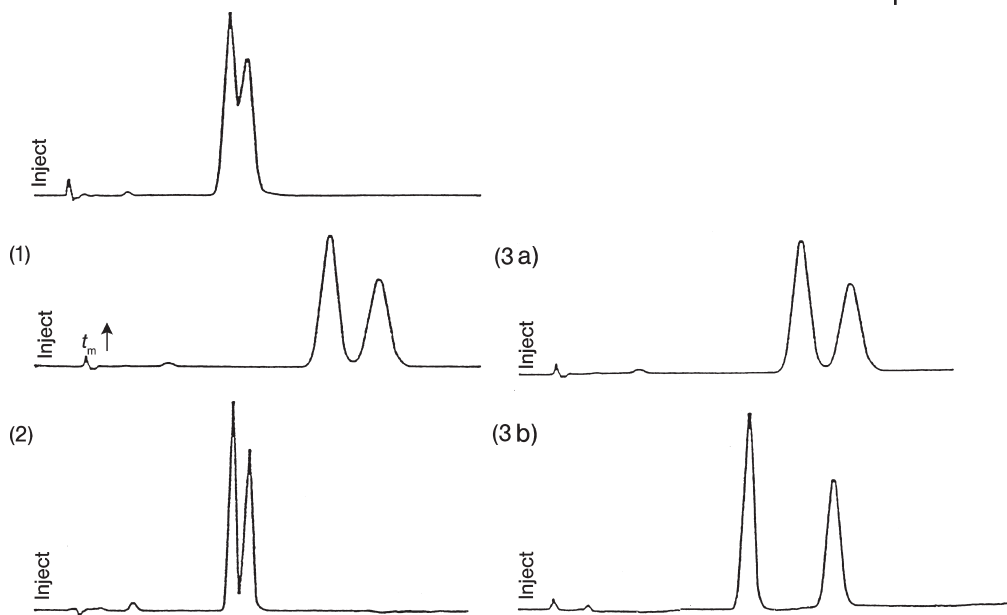


Abb. 1 Prinzipielle Möglichkeiten zur Verbesserung der Auflösung in der HPLC. Erläuterungen siehe Text.

Möglichkeit 2: Die Retentionszeit bleibt im Wesentlichen konstant, ich Sorge lediglich für eine bessere Peakform. Hier gibt es etwas mehr Möglichkeiten: Verringerung des Totvolumens (z. B. dünnere Kapillaren, kleinere Detektorzelle), Verringerung des Injektionsvolumens (merke: eine lokale Überladung der Säule und damit Peakverbreiterung kommt häufiger vor, als man denkt: Die Bandenverbreiterung, verursacht durch die Injektion, verhält sich direkt proportional zum Injektionsvolumen.), bei Mischungen gleicher Elutionskraft Methanol gegen Acetonitril (ACN) austauschen – wegen der geringeren Viskosität – (bedingt konstante Retentionszeit), kleinere Teilchen verwenden, neue, besser gepackte Säule einsetzen. In diesem Zusammenhang sollte man auch an eine Optimierung der Injektion denken, die ebenfalls zu einer Verbesserung der Peakform und damit zur Erhöhung der Bodenzahl führt: Das Probenlösungsmittel sollte schwächer sein als der Eluent. Dazu verwende man zum Auflösen der Proben z. B. etwas mehr Wasser im Vergleich zur Eluentenzusammensetzung. Dadurch kann eine Aufkonzentrierung der Substanzzone am Säulenkopf erreicht werden. Das Ergebnis ist eine bessere Peakform.

Schließlich denke man auch an diverse Einstellungen wie „sample rate“, „bunching factor“, „peak width“, Spaltbreite bei einem Dioden-Array-Detektor usw. Auch dadurch kann man die Peakform merklich verbessern, ohne eine Änderung von „echten“ Methodenparametern, wie Säule oder Eluent, vorgenommen zu haben.

Möglichkeit 3a: Zunahme der Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase. Hier gibt es ja „nur“ die bereits erwähnten drei „chemischen“ Möglich-

keiten: Änderung des Eluenten (z. B. Erhöhung des Wasseranteils), Erniedrigung der Temperatur, Änderung der stationären Phase (z. B. eine hydrophobere Phase verwenden).

Die Wechselwirkungen nehmen bei beiden zu trennenden Komponenten im gleichen Maße zu, die Retentionszeit nimmt ebenfalls gleichmäßig zu.

Möglichkeit 3b: Vorgehensweise wie unter Möglichkeit 3a, aber hier ist es gelungen, dass die Änderung der Wechselwirkungen für beide Komponenten unterschiedlich stark ausfällt: Die eine Komponente reagiert stärker auf die Änderung als die andere, z. B. durch Änderung des pH-Wertes.

Andere Möglichkeiten gibt es prinzipiell nicht. Denn noch einmal: $R = f(N, \alpha, k)$. Das bedeutet Folgendes: Wenn wir alle in der HPLC-Welt versuchen, die Auflösung zu verbessern, machen wir nichts anderes, als bewusst oder intuitiv an diesen drei Faktoren, die die Auflösung beeinflussen können, zu „drehen“:

1. Es gelingt uns, die Wechselwirkungen der uns interessierenden Komponenten mit der stationären Phase per se zu erhöhen, also „alles“ eluiert später (Möglichkeit 3a, Zunahme von k , z. B. Anteil von Wasser im Eluenten erhöhen). Oder es gelingt uns, die Wechselwirkung der Komponenten mit der stationären Phase individuell zu verändern, d. h., eine Komponente reagiert auf diese Änderung mehr/stärker als die andere (Möglichkeit 3b, Zunahme von α , z. B. pH-Wert-Änderung bei polaren/ionischen Komponenten). Beides hat mit „Chemie“ zu tun: Änderung der Temperatur oder Änderung des Eluenten (dazu gehören selbstverständlich der pH-Wert und sonstige Additiva) oder Änderung der stationären Phase.
2. Wir erhöhen die Bodenzahl, entweder bei (theoretisch) konstanter Retentionszeit, Möglichkeit 2 oder bei einer gleichzeitigen Zunahme der Retentionszeit, Möglichkeit 1.

Andere Möglichkeiten gibt es prinzipiell nicht!

Bemerkung: Selbstverständlich ändert sich bei einer Änderung von α und/oder k gleichzeitig auch N .

Nachdem wir gesehen haben, wie die Auflösung prinzipiell verbessert werden kann, stellen sich nun folgende zwei Fragen:

1. Welche der drei Möglichkeiten „bringt“ das meiste?
2. In welcher Reihenfolge sollte ich bei Optimierungsversuchen diese Parameter verändern, d. h., welche Vorgehensweise ist ökonomisch?

1.1.3.2 Was „bringt“ das meiste?

Betrachten wir erneut die Gleichung für die Auflösung:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{k_2 + 1}$$

Wie man der Formel entnehmen kann, reagiert R auf eine Änderung von α am empfindlichsten.

Somit ist eine Veränderung der Selektivität die eleganteste, häufig allerdings auch die am schwierigsten zu realisierende Maßnahme zur Verbesserung der Auflösung. Betrachten wir zur besseren Veranschaulichung zwei Zahlenbeispiele:

1. Bei einem α -Wert von 1,01 für zwei benachbarte Peaks brauche ich für eine Basislinien-Trennung 160.000 Böden. Wäre es möglich, den α -Wert auf 1,05 zu erhöhen, bräuchte ich für die gleiche Trennung lediglich ca. 2000 Böden! Anders formuliert: Wenn es mir gelingt, die Selektivität auch nur minimal zu verbessern, brauche ich für eine gegebene Auflösung wenig Böden, d. h., ich kann mir leisten, den Fluss zu erhöhen oder eine kürzere Säule einzusetzen – und beides führt ja zu kürzeren Analysenzeiten: Die „paar“ Böden, die ich durch die Flusserrhöhung bzw. durch die Verkürzung der Säulenlänge verliere, stören mich auf Grund der verbesserten Selektivität nicht.
2. An einer Säule mit 9000 Böden eluiere die zweite der zu trennenden Komponenten mit einem k -Wert von 2, der α -Wert sei 1,05. Die aus diesen Werten errechnete Auflösung beträgt 0,75:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{9000} \cdot \frac{1,05 - 1}{1,05} \cdot \frac{2}{2 + 1} = 0,75$$

Die Forderung für diese Trennung laute: Auflösung, mindestens $R = 1$ oder größer.

Welche Möglichkeiten gibt es nun?

Gelingt es, bei ähnlich starker Wechselwirkung (also in etwa konstanter k -Wert) den α -Wert auf 1,10 zu erhöhen, ergibt sich eine um ca. Faktor 2 erhöhte Auflösung!

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{9000} \cdot \frac{1,10 - 1}{1,10} \cdot \frac{2}{2 + 1} = 1,44$$

In der Abfolge der effektivsten Maßnahmen zur Verbesserung der Auflösung steht hinter der Selektivität direkt die Effizienz. Die Erhöhung der Bodenzahl gelingt entweder entsprechend dem klassischen Ansatz durch Erhöhung der Säulenlänge – wobei bei einer Verdoppelung der Säulenlänge und damit Verdoppelung der Retentionszeit und der Bodenzahl die Auflösung nur um $\sqrt{2}$, also um Faktor 1,4 erhöht wird – oder heute häufiger durch eine Abnahme der Korngröße bei konstanten Säulendimensionen und somit auch konstanter Retentionszeit.

Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Bodenzahl, wie bessere Packungsqualität oder Verringerung des Totvolumens der Apparatur (s. oben), dürften allgemein geläufig sein und werden hier nur erwähnt. Ein Zahlenbeispiel zur Verbesserung der Auflösung über die Bodenzahl findet sich unten.

Die dritte, einfachste, jedoch ab einem k -Wert von ca. 4 recht ineffektive Maßnahme ist die Erhöhung des k -Wertes. Auch dies soll anhand unseres Zahlenbeispiels demonstriert werden. Man könnte mit dem Ziel einer besseren Auflösung die Wechselwirkung erhöhen, zuerst vom ursprünglichen k -Wert von 2 auf einen k -Wert von 4, dann auf 6.

12 | 1 Grundsätzliches zur Optimierung

Die Auflösung verbessert sich dadurch auf 0,90 bzw. 0,97:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{9000} \cdot \frac{1,05 - 1}{1,05} \cdot \frac{4}{4 + 1} = 0,90$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{9000} \cdot \frac{1,05 - 1}{1,05} \cdot \frac{6}{6 + 1} = 0,97$$

Wir würden hier eine eher geringe Verbesserung der Auflösung bei einer allerdings merklichen Verlängerung der Analysenzeit erzielen (k -Wert von 6). Die Erhöhung der Wechselwirkung (z. B. Wasseranteil im Eluenten vergrößern) ist demnach eine im Alltag übliche, leicht zu realisierende, aber häufig recht ineffektive Maßnahme zur Verbesserung der Auflösung. Könnte ich jedoch bei einem k -Wert von 4 die Bodenzahl beispielsweise auf 15.000 erhöhen (kleinere Teilchen, Tricks beim Injizieren usw.), ließe sich die Auflösung immerhin auf 1,17 erhöhen:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{15\,000} \cdot \frac{1,05 - 1}{1,05} \cdot \frac{4}{4 + 1} = 1,17$$

1.1.3.3 Welche Reihenfolge der Maßnahmen ist bei Optimierungsversuchen sinnvoll?

Abbildung 2 zeigt vereinfacht eine ökonomische Vorgehensweise, die im Folgenden erläutert wird.

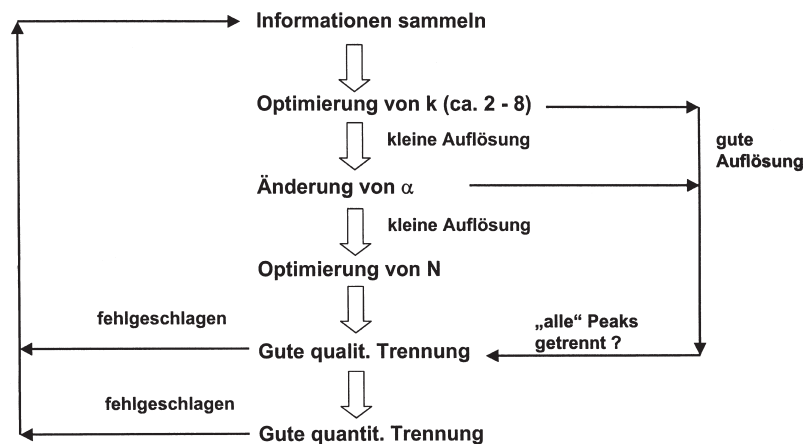


Abb. 2 Strategie einer Methodenentwicklung.

Bemerkung: Steht eine Kopplungstechnik, z. B. LC/MS, zur Verfügung, so sollte diese Möglichkeit direkt zu Beginn oder wenigstens in einem sehr frühen Stadium genutzt werden (s. auch Abschnitt 1.1.4.3).

1. Frage: „Vernünftige“ Wechselwirkungen, akzeptable Analysendauer?

Nach einem ersten „Schuss“ bei einer unbekanntem Probe oder bei Übernahme einer bestehenden Methode sollte vor jeglichen weiteren Optimierungsschritten

die erste Frage lautet: Habe ich „vernünftige“ Wechselwirkungen? Die interessierenden Komponenten sollten bei isokratischen Trennungen im Bereich von ca. $k = 2-8$ eluieren, bei Gradiententrennungen mit einem \bar{k} von ca. 5 für die Mitte des Chromatogramms (s. Abschnitt 1.1.3.4.2). Diese Bereiche stellen einen guten Kompromiss zwischen Analysendauer, Robustheit und Auflösung dar. Sind die Wechselwirkungen in Ordnung (k -Wert überprüfen!), aber die Analysendauer inakzeptabel, sollte der Fluss erhöht oder alternativ eine kürzere Säule eingesetzt werden.

2. Frage: Kann ich jetzt schnell über optimierte Einstellungen Informationen über die Peakhomogenität erhalten?

Bin ich mit der Analysendauer vorerst zufrieden, aber nicht mit der Auflösung, sollte ich zunächst klären, ob ich für die aktuelle Trennung (z. B. frühe/späte, schmale/breite Peaks) die Einstellungen wie „sampling time/period“, „peak width“, aber auch Wellenlänge usw. optimal gewählt habe. Anschließend gilt bei Bedarf meine Aufmerksamkeit dem effektivsten der drei Parameter, der Selektivität.

3. Frage: Ist die Selektivität ausreichend?

Habe ich nun eine kurze Analysenzeit und mit einem vertretbaren Aufwand eine zufrieden stellende Selektivität erreicht (Trennfaktor des kritischen Paares ca. 1,05–1,1), bin jedoch mit der Auflösung immer noch nicht zufrieden, so sollte ich jetzt die Effizienz erhöhen, also einfach ausgedrückt, die Peakform verbessern.

4. Frage: Kann ich die Bodenzahl erhöhen oder muss ich mich tatsächlich weiterhin mit der Selektivität beschäftigen, um eine bessere Auflösung zu erzielen?

Die Peakform zu verbessern – gleichbedeutend mit Bodenzahl erhöhen – ist häufig ökonomischer, als weiterhin zu versuchen, die Selektivität zu verbessern (Wechsel der „Chemie“, also von Säule und Eluent), um die gewünschte Auflösung zu erzielen.

Zwei reale Beispiele, aus [1] entnommen, sollen die oben aufgeführten Aussagen veranschaulichen:

Beispiel 1

Abbildung 3a zeigt das Chromatogramm einer bestehenden, validierten Methode aus dem Pharmabereich.

Die Methodenparameter lauten: Linearer Gradient von 10 % auf 90 % Methanol, übliche C_{18} -Phase, 5 μm , Säule 125 \times 4 mm, Fluss 1 mL/min, Raumtemperatur, Injektion von 30 μL Probe in Tetrahydrofuran (THF)/Acetonitril (ACN) gelöst. Der große Peak an der Totzeit wird von Matrixbestandteilen hervorgerufen und stört weiter nicht. Diese Trennung, die nicht als optimal zu bezeichnen ist, sollte auf schnelle und einfache Weise optimiert werden.

14 | 1 Grundsätzliches zur Optimierung

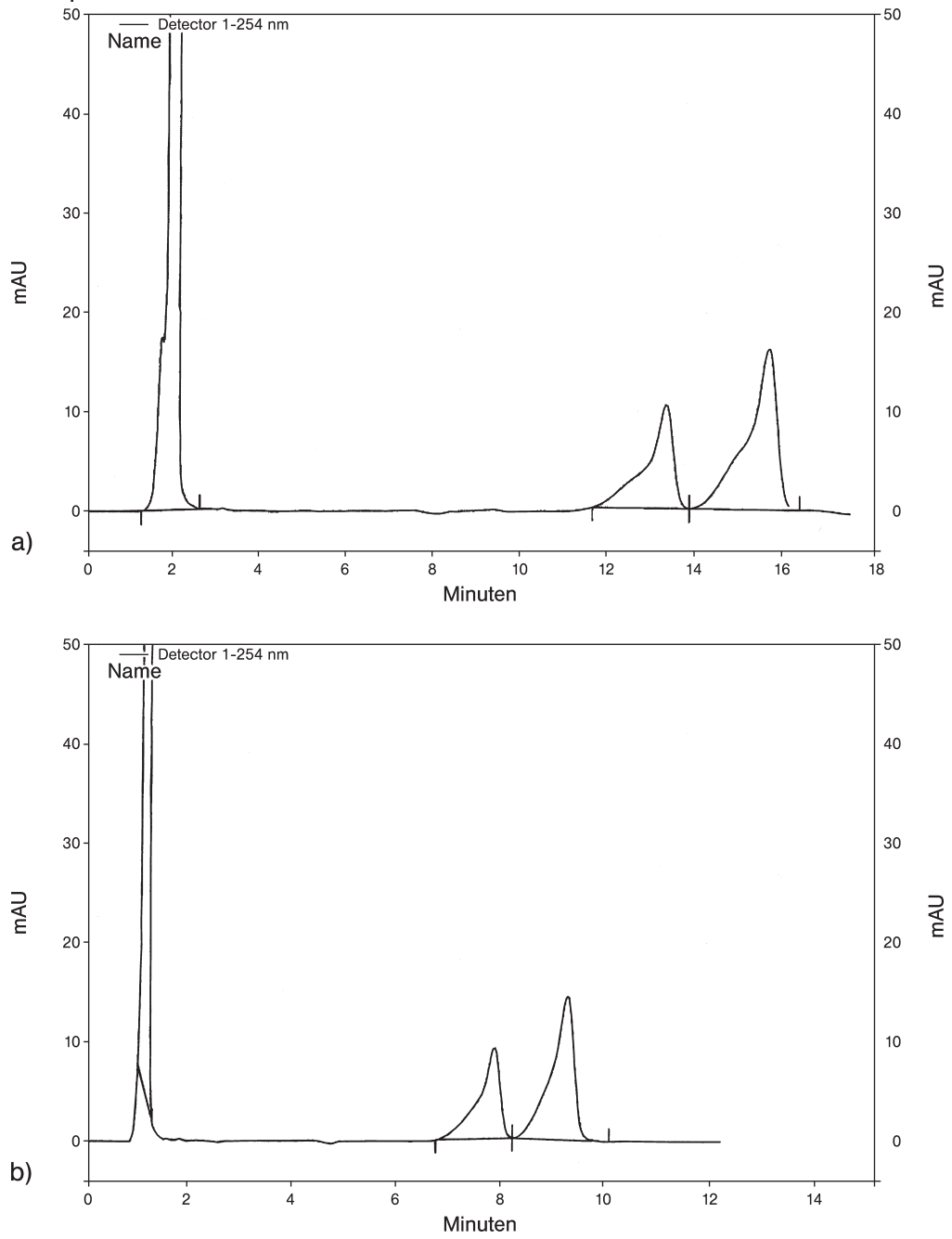


Abb. 3 Schnelle Optimierung einer bestehenden Methode; Erläuterungen siehe Text.

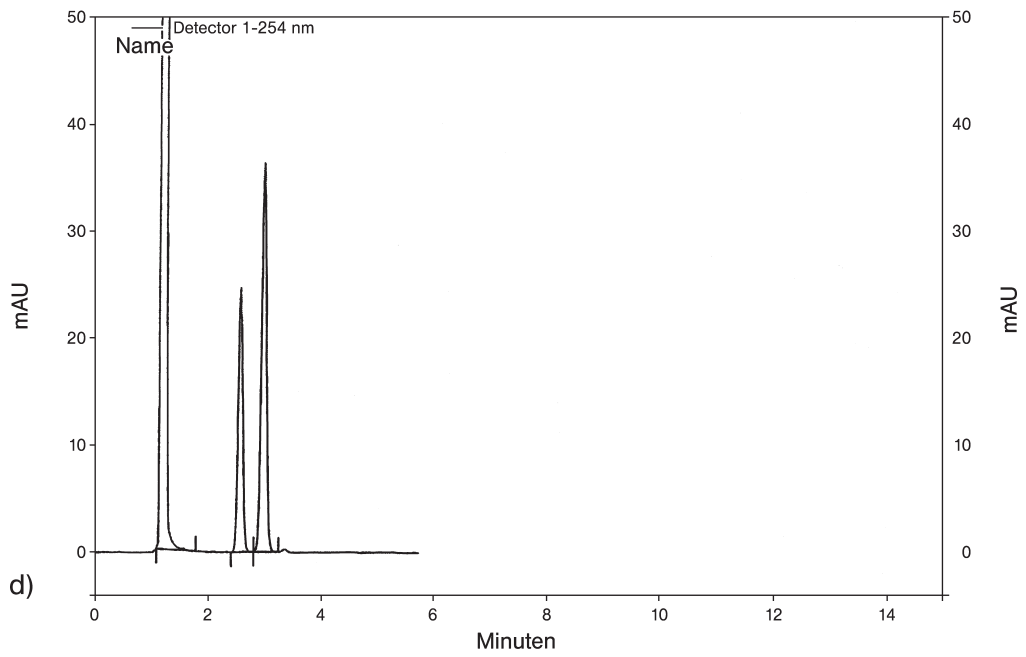
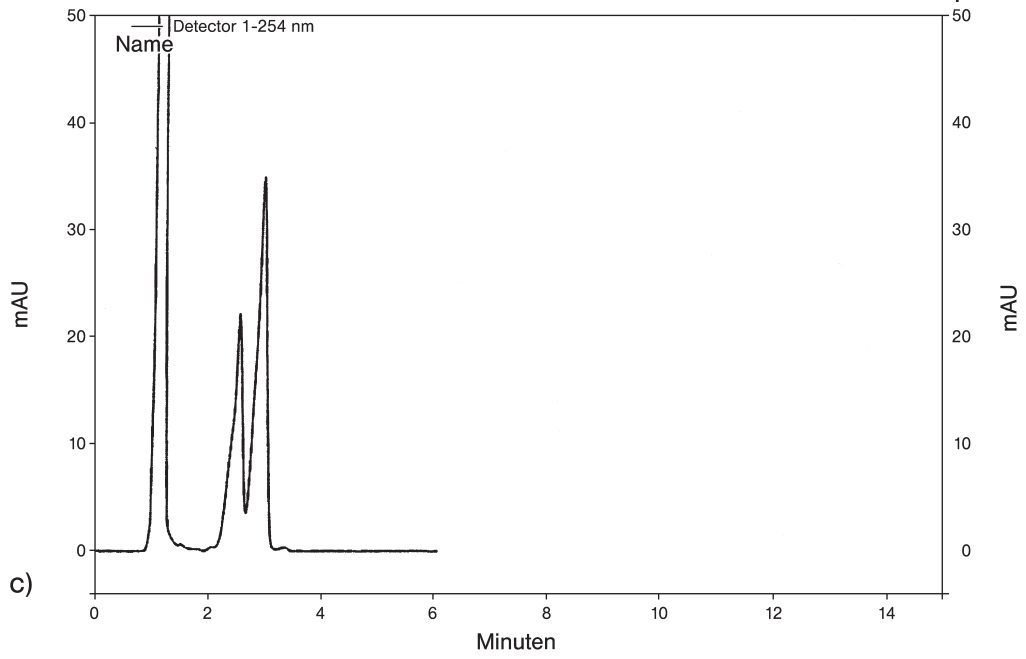


Abb. 3 (Fortsetzung)

1. Frage: Analysendauer OK?

Nein. Das Erste, was stört, ist in der Tat die lange Analysenzeit: 16 min für zwei Peaks bei einer Routinemethode ist heute kaum vertretbar. Zuerst wurde der Fluss auf 2,6 mL/min erhöht. Wie zu erwarten, ergab sich eine geringere Analysendauer – ohne dass die Auflösung schlechter wurde. Wir hatten den Gradienten so angepasst, dass sich das gleiche Gradientenvolumen ergab (Abb. 3b, s. Kap. 1.2).

Die Retentionszeit von 10 min ist jedoch für zwei Peaks immer noch zu lang. Nachdem der Druck bei dem aktuellen Fluss von 2,6 mL/min ca. 345 bar betrug, wurden als Nächstes die Anfangsbedingungen beim Gradienten verändert: Es wurde nicht bei 10 %, sondern bei 40 % Methanol begonnen (s. Abb. 3c). Mit der Retentionszeit von 3–4 min für zwei Peaks konnte man nun zufrieden sein.

2. und 3. Frage: Einstellungen OK, Selektivität OK?

Ja, s. Abstand zwischen den Peakspitzen in Abb. 3c (das ist vereinfacht die Selektivität). Die Auflösung ist jedoch immer noch nicht ausreichend. Obwohl die Selektivität offensichtlich nicht schlecht war, konnte die Auflösung aufgrund des Frontings nicht als zufrieden stellend bezeichnet werden.

4. Frage: Kann ich die Peakform verbessern und damit die Bodenzahl erhöhen?

Ja, wir haben hier etwas Einfaches getestet: Die Probenlösung wurde zweimal mit dem Eluenten verdünnt (40/60 MeOH/H₂O) und die resultierenden 120 µL erneut injiziert. Mit dem Ergebnis konnte man nun zufrieden sein (s. Abb. 3d).

Merke: Es ist besser, 100 oder 150 µL eluentähnliche Probenlösung als 20 oder 30 µL Probenlösung in einem im Vergleich zum Eluenten stärkeren Probenlösungsmittel zu injizieren.

Fazit: Im besprochenen Fall wurde zuerst die Analysenzeit optimiert und anschließend – da die Selektivität augenscheinlich ausreichend war – eine gute Auflösung lediglich durch eine Verbesserung der Peakform (Erhöhung der Bodenzahl) erreicht.

Beispiel 2

Abbildung 4 zeigt die isokratische Trennung von Metaboliten trizyklischer Antidepressiva. In Abb. 4a ist die Trennung an einer 5 µm Luna C₁₈-Säule dargestellt. Das kritische Paar (Peak 2 und 3 bei ca. 5,8 min) wird gerade angetrennt, der α -Wert beträgt 1,05.

Die Auflösung ist nicht ausreichend, es besteht Handlungsbedarf.

Hier können wir die 1. Frage, nämlich ob die Analysendauer OK ist, mit einem „ja“ beantworten. Was die Selektivität betrifft, ist die Einschätzung zugegebenermaßen schwieriger.

Würde man hier direkt die Trennung durch Wechsel von Säule und/oder Eluent verbessern wollen (also via Selektivität, „Chemie“), wäre dies vermutlich keine sehr rasche Angelegenheit. In Abb. 4b wird die Trennung unter völlig gleichen

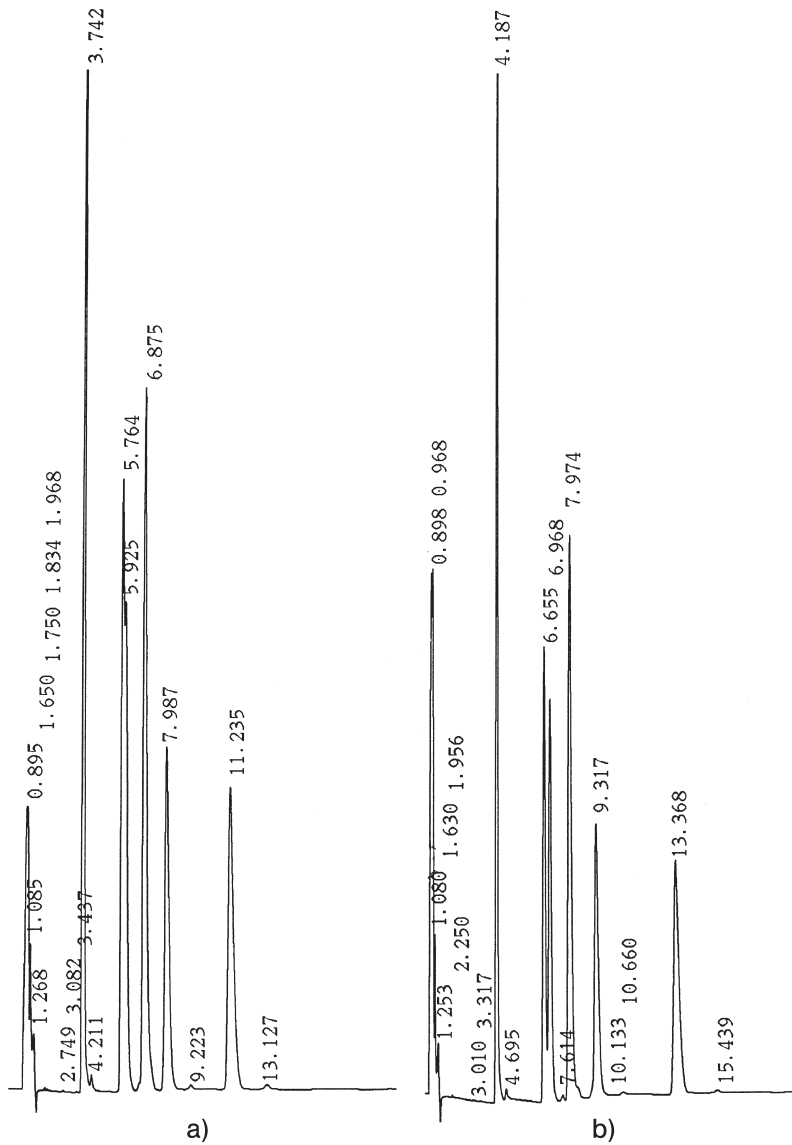


Abb. 4 Verbesserung der Auflösung über die Bodenzahl.

Bedingungen, allerdings an einer 3 μm -Säule dargestellt. Bei praktisch gleicher Selektivität (α -Wert = 1,04) wird nahezu eine Basislinien-Trennung erreicht. Das Einsetzen einer Säule mit einer geringeren Korngröße ist ein schneller und häufig auch ein ökonomischer Weg. *Merke:* Sogar bei einer erreichten Selektivität von „nur“ 1,05 sollte man zunächst an eine Verbesserung der Auflösung über die Effizienz (N) denken, statt sich weiterhin den doch aufwendigeren „chemischen“ Möglichkeiten zu widmen: Säule, Eluent, Temperatur.

Als vereinfachtes Fazit und als Extrakt aus Beispiel 1 und 2 kann Folgendes geschlussfolgert werden („ $k\alpha N$ -Prinzip“):

1. Sorgen Sie aus Gründen der Ökonomie zunächst für „vernünftige“ Wechselwirkungen (k) und akzeptable Retentionszeiten (z. B. durch Veränderung der Eluentenzusammensetzung, Flusserhöhung).
2. Versuchen Sie anschließend, mit einem vertretbaren Aufwand eine möglichst gute Selektivität zu erreichen: Das wären α -Werte um ca. 1,05–1,10 (z. B. organisches Lösungsmittel ändern, Modifier zusetzen, pH-Wert verändern).
3. Sind Sie mit der Auflösung immer noch nicht zufrieden, verbessern Sie jetzt die Peakform (N). Dies kann zum einen durch „wissenschaftliche“ Maßnahmen erreicht werden, z. B. kleinere Teilchen, am effektivsten in folgender Kombination: Säulenlänge und Teilchengröße erniedrigen, Fluss und evtl. Temperatur erhöhen. Zum anderen sollte man auch an einfache, aber nicht minder Erfolg versprechende „Tricks“ denken, die ebenfalls zu einer besseren Peakform führen: kleineres Injektionsvolumen, optimiertes Probenlösungsmittel, dünne/kurze Kapillaren.

1.1.3.4 Wie ändere ich k , α und N ?

1.1.3.4.1 Isokratischer Modus

Bevor wir uns mit den Strategien zur Methodenentwicklung bei unbekanntem Proben und zur Überprüfung der Peakhomogenität beschäftigen, schauen wir uns an, welche konkreten Maßnahmen zur Verfügung stehen, um k , α und N zu verändern bzw. zu erhöhen (s. Abb. 5).

Bemerkung: In der angegebenen Abfolge der einzelnen Maßnahmen in Abb. 5 nimmt die Effektivität (Zeitfaktor und Wichtigkeit) in der Regel ab. Das heißt natürlich nicht, dass beispielsweise die stationäre Phase bzgl. Selektivität eine untergeordnete Rolle spielt! Keinesfalls. Nur sollte man die anderen, schnelleren Möglichkeiten testen, bevor eine völlig neue Säule – in der Praxis häufig auf „gut Glück“ – ausprobiert wird (s. auch unten).

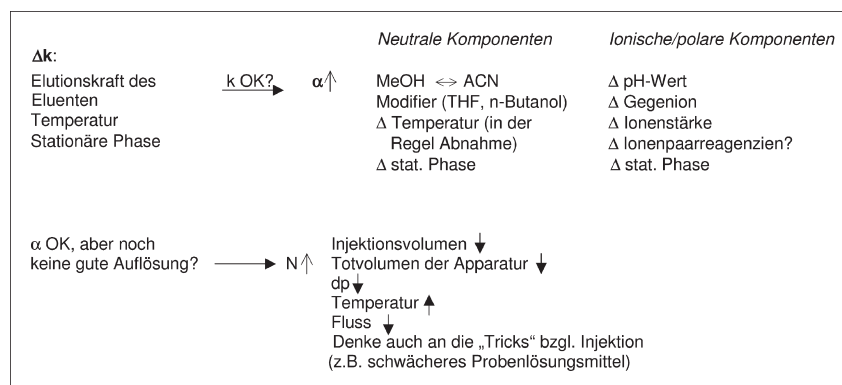


Abb. 5 Mögliche Maßnahmen zur Verbesserung der Auflösung.

1.1.3.4.2 Gradientenmodus

Vorbemerkung

Werden bei einer Gradiententrennung nicht mehr als 8–10 Peaks erwartet und liegt keine „schwierige“ Matrix wie Fermenterbrühe, Urin, Creme, Pflanzenextrakt usw. vor, so sind 125 oder gar 100 mm lange Säulen in der Regel entschieden zu lang (s. [1] und Ausführungen in Kap. 1.2 und Kap. 2.7.3). Wir konnten tatsächlich in vielen Fällen an einer üblichen HPLC-Anlage problemlos 4–6 Peaks an einer 10 mm/2 mm/2 μm C_{18} -Säule trennen.

Für Gradiententrennungen gilt folgende Formel:

$$\bar{k} = \left(\frac{t_G}{\Delta\%B} \right) \cdot \left(\frac{F}{V_m} \right) \cdot \left(\frac{100}{S} \right)$$

\bar{k} = mittlerer k -Wert; der Analyt befindet sich in der Mitte der Säule (Längsrichtung)

t_G = Gradientendauer [min]

F = Fluss [mL/min]

V_m = Säulenvolumen

$\Delta\%B$ = Änderung von B während der Gradientelution

S = Steigung der $\%B/t_G$ -Kurve; für kleine Moleküle kann für S ein Wert von ca. 5 angenommen werden.

Der \bar{k} - und natürlich auch der α -Wert können wie folgt verändert werden:

- Gradientenvolumen (über die Gradientendauer oder eleganter über die Flussrate);
- Steilheit des Gradienten;
- $\%B$, also Anfangs- und Endbedingungen;
- Gradientenprofil (linear, konvex, konkav).

Bemerkung: Ist ein Methodentransfer geplant, sollten mit dem Ziel einer einfachen Übertragbarkeit nur lineare Gradienten verwendet werden. Der Einbau von isokratischen Stufen sollte dagegen kein größeres Problem darstellen;

- Temperatur;
- Stationäre Phase.

Aus pragmatischer Sicht sollte bei Gradientenläufen stets an einen höheren Fluss gedacht werden: Die Erhöhung des Flusses bei konstant gehaltener Gradientendauer führt zu einer besseren Auflösung, da das Gradientenvolumen (Gradientenvolumen = Fluss \times Zeit) zunimmt. Die Peakkapazität (Peakkapazität: Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit) und damit die Auflösung ihrerseits nehmen mit dem Gradientenvolumen ebenfalls zu. Auch für den Fall, dass die Auflösung zufrieden stellend ist, kann/sollte der Fluss erhöht werden: Eine Erhöhung beispielsweise um Faktor 2 bei gleichzeitiger Erniedrigung der Gradientendauer ebenfalls um Faktor 2 – und natürlich entsprechender Anpassung des Gradienten – ergibt die gleiche Auflösung, da das Gradientenvolumen konstant bleibt, allerdings in der Hälfte der Zeit! Der Nachteil, den eine erhöhte Flussrate mit sich bringt, ist der höhere Druck und die Abnahme der Peakflächen.

Die Erhöhung der Bodenzahl bei Gradiententrennungen stellt meist ein untergeordnetes Ziel dar, sind doch die Peaks in aller Regel per se schmal.

1.1.3.4.3 Acetonitril oder Methanol?

An anderen Stellen [1, 2] wurde diese Frage ausführlich diskutiert (s. dazu auch Kap. 2.1.4). Fassen wir hier das Ergebnis in Kurzform zusammen, das nach einer Reihe von Experimenten mit diversen Substanzklassen und bei unterschiedlichen Bedingungen erhalten wurde: Es scheint so zu sein, dass bei Mischungen gleicher Elutionskraft Methanol die bessere Selektivität liefert (protisches vs. aprotisches Lösungsmittel). Dies macht sich vor allem bei kleinen polaren Molekülen, wie primären Aminen, bemerkbar. Gleichzeitig wird wegen der erhöhten Viskosität im Vergleich zu Acetonitril in aller Regel eine schlechtere Peakform beobachtet. Das soll an zwei Beispielen, entnommen aus [2], demonstriert werden (s. Abb. 6 und 7).

In Abb. 6 geht es um die Injektion von Uracil, Pyridin, Benzylamin und Phenol, links im sauren Methanol/Phosphatpuffer, rechts im sauren Acetonitril/Phosphatpuffer. Dieser ungünstige Eluent (starke Basen im Sauren) wurde bewusst gewählt, um gerade die Selektivität von Methanol/Acetonitril für polare Analyten in „schwierigen“ Situationen zu testen. In Methanol werden die Basen immerhin angetrennt, in Acetonitril nicht. In Abb. 7 wird die gleiche Trennung im Neutralen demonstriert, links in Methanol, rechts in Acetonitril. Auch hier ist die bessere Selektivität in Methanol augenscheinlich: Zum einen werden in Methanol die polaren

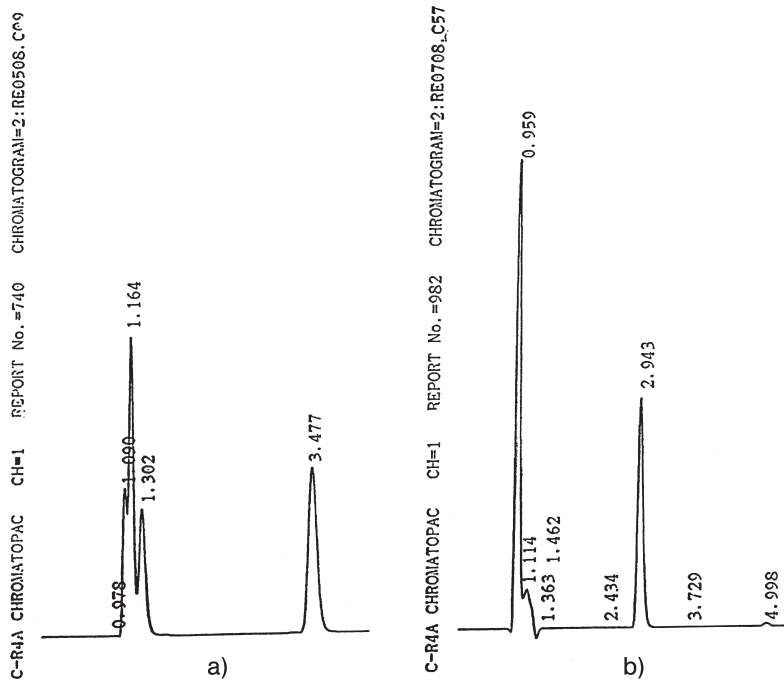


Abb. 6 Zur Selektivität im sauren Phosphatpuffer/Methanol (links) und im sauren Phosphatpuffer/Acetonitril (rechts); Erläuterungen siehe Text.

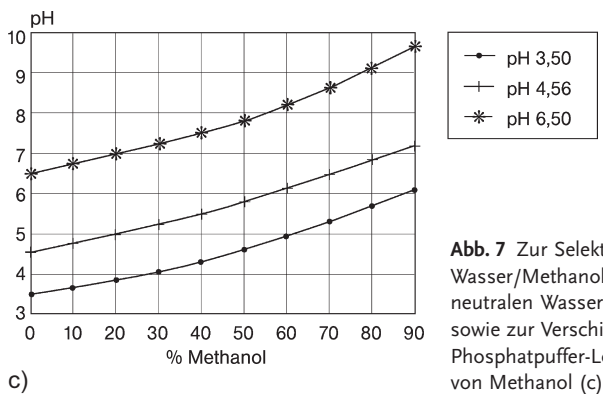
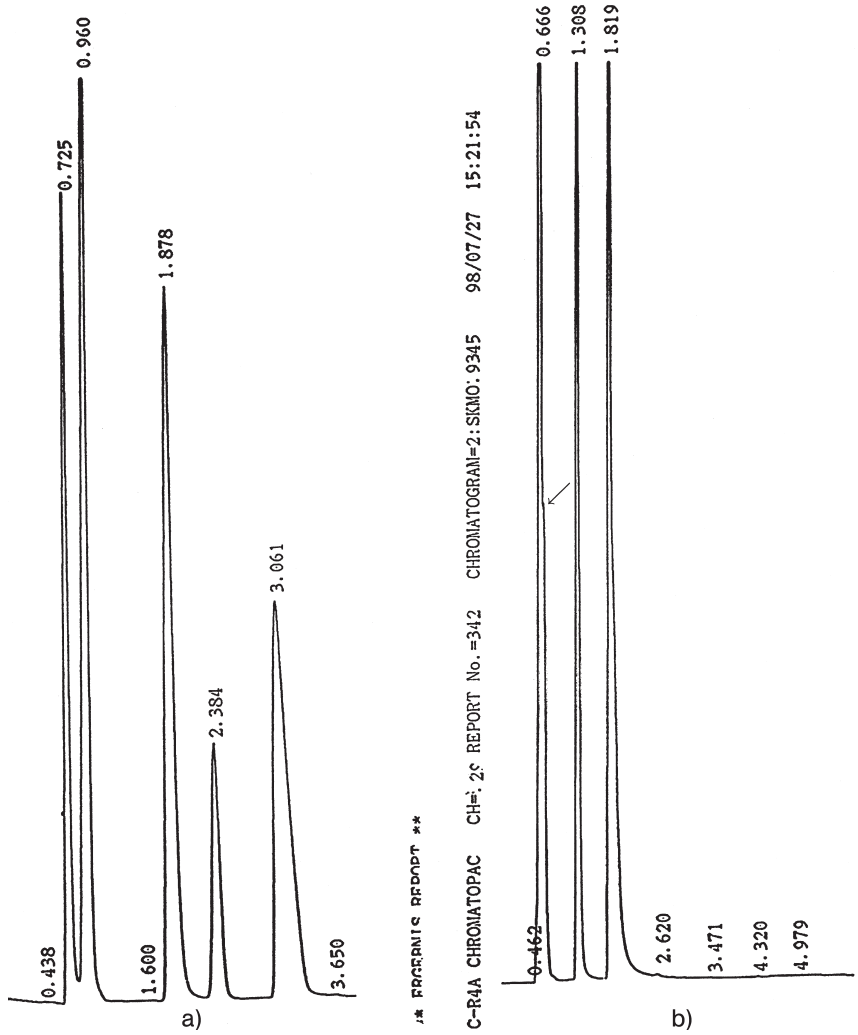


Abb. 7 Zur Selektivität im neutralen Wasser/Methanol-Eluenten (a) und im neutralen Wasser/Acetonitril-Eluenten (b) sowie zur Verschiebung des pH-Wertes einer Phosphatpuffer-Lösung nach der Zugabe von Methanol (c); Erläuterungen siehe Text.

Verunreinigungen fast vollständig von Uracil abgetrennt, während in Acetonitril gerade eine Antrennung erkennbar wird. Zum anderen wird in Methanol Phenol von Benzylamin abgetrennt, in Acetonitril nicht. Halten wir fest: In beiden Fällen erhalten wir in Methanol eine bessere Selektivität, in Acetonitril eine bessere Peaksymmetrie – eine Beobachtung, die auf viele Substanzklassen zutrifft.

Mögliche Erklärung:

Zur Zeit wird die Vorstellung diskutiert, dass an der Oberfläche eines RP-Materials so genannte aktive Zentren („high energy sites“) existieren, die – trotz einer angenommenen Oberfläche dieser Zentren von ca. nur 0,4 % der zur Verfügung stehenden Gesamtoberfläche – eine dominante Rolle bzgl. Selektivität spielen. Und just jene Zentren stehen polaren/ionischen Komponenten bei Methanolgehalten im Eluenten von ca. 0–60 % zur Verfügung. Bei einer experimentell gemessenen Lösungsmittel-Schicht an der Oberfläche von ca. 2,5 Å bei Methanol bzw. ca. 13 Å bei Acetonitril kann der hydrophobe Rest von polaren/ionischen Molekülen in Acetonitril „nur“ mit dem Ende der an der Oberfläche verankerten Alkylketten wechselwirken. Im Falle von Methanol im Eluenten können die Moleküle durch die wesentlich dünnere Lösungsmittel-Schicht hindurch diffundieren und stärkere/zusätzliche Wechselwirkungen eingehen. Darüber hinaus könnte die Bildung von labilen Methanolaten polare Wechselwirkungen erleichtern, welche zu einer guten polaren Selektivität in Methanol führen. Es sei zum Schluss auf drei experimentell festgestellte Beobachtungen hingewiesen:

1. Bei kleinen Gehalten an Methanol/Acetonitril im Eluenten sind die Selektivitätsunterschiede recht schwach ausgeprägt.
2. Die Selektivitätsunterschiede zwischen Methanol- und Acetonitril-haltigen Eluenten machen sich vor allem bei stark hydrophoben stationären Phasen bemerkbar, am wenigsten bei polaren stationären Phasen wie z. B. CN.
3. Der pH-Wert einer Lösung driftet nach der Zugabe von Methanol stärker ins Alkalische als nach der Zugabe von Acetonitril (siehe auch Ausführungen in Kap. 1.3 und Tabelle 1 in Kap. 1.4).

In Abb. 7c wird die Änderung des pH-Wertes eines 20 mMol starken Na-Puffers nach der Zugabe von Methanol dargestellt. Dieser Fakt erklärt, warum häufig die Lebensdauer einer Säule, die bei einem nominellen pH-Wert des Eluenten von 6 oder 7 betrieben wird, zu wünschen übrig lässt: Nach der Zugabe von Methanol driftet der pH-Wert ins Alkalische und die meisten Kieselgele werden ab ca. pH 8 teilweise aufgelöst.

1.1.4

Überprüfung der Peakhomogenität – das Drei-Stufen-Modell

Die Frage könnte auch wie folgt lauten: *Ich erkenne gerade einen möglichen Aufsetzer an der Flanke, wie kann ich die Auflösung verbessern?*

Überprüfung der Peakhomogenität und Verbesserung der Auflösung sind verwandte Fragestellungen. Für beides kann als Lösungsansatz ein Drei-Stufen-Konzept angewandt werden.

Stufe 1: Schnelle und kostengünstige Maßnahmen zur Überprüfung der Peakhomogenität – die „1/2 Stunden-Methode“

Nehmen wir an, Sie verfügen über ein recht begrenztes Zeitpensum oder/und Sie sind an eine Prüfvorschrift bzw. an Kundenvorgaben gebunden, d. h., de facto sind Eluent, Temperatur und stationäre Phase „tabu“. Welche Möglichkeiten hätte man dennoch, das Chromatogramm besser darzustellen bzw. die Trennung tatsächlich zu verbessern? Wir gehen von einer heute üblichen apparativen Ausstattung aus.

1. Nutzen Sie die Möglichkeiten des Dioden-Arrays/der Software aus, z. B.: Ratioplot, Contourplot, 3D-Plot, 1. und 2. Ableitung des in Frage kommenden Peaks bilden.
2. Stellen Sie sich die Frage: Sind die Einstellungen am Detektor/an der Software optimal, kann ich an der Hardware noch etwas optimieren?
Nachfolgend einige Möglichkeiten bzw. Zahlenwerte als Vorschlag:
Bei älteren Geräten: Herabsetzung der Zeitkonstanten auf 0,1 s und Verwendung des 10 bzw. 100 mV-Ausgangs des Detektors. Bei den moderneren Geräten erfolgt eine ähnliche Manipulation über die Einstellung „bunching factor“ bzw. „bunching rate“ an der Software.
Peakbreite bei der Integration auf 0,01 min, „sample rate“ auf ca. 5–10 Datenpunkte/s, „sampling period“ auf 200 ms setzen. Diese Einstellungen sind bei frühen, schmalen Peaks besonders wichtig bzw. notwendig. Verwenden Sie sehr kurze/dünne Säulen und erhalten „wirklich“ schnelle Peaks, so sind mindestens 20–40 Hz ein unbedingtes „Muss“.
Sind Wellenlänge, Spaltbreite, Referenzwellenlänge optimal eingestellt?
Beträgt der Innendurchmesser der Kapillare zwischen Probengeber und Detektor 0,13 mm, höchstens 0,17 mm?
3. Denken Sie an die Injektion!
Injizieren Sie zur Überprüfung der Peakhomogenität einfach 1 oder 2 μL – die Gefahr einer lokalen Überladung der Säule ist häufig gegeben. Verdünnen Sie die Probenlösung mit Wasser oder einfach mit dem Eluenten und injizieren Sie erneut.

Eine Änderung von Einstellungen oder die erneute Injektion ist eine Angelegenheit von Sekunden oder einigen Minuten. Es folgen drei Beispiele, die zeigen, dass es sich lohnt, auch an solche einfachen Maßnahmen zu denken.

Abbildung 8a zeigt eine Trennung bei einer Datenrateaufnahme von 1, Abb. 8b bei 10 Datenpunkten pro Sekunde: Bei früh eluierenden Peaks verliert man bei einer kleinen Datenrateaufnahme unnötig an Auflösung.

Abbildung 9b zeigt die Injektion von 20 μL Acetophenon in einem üblichen RP-System. Man würde spontan annehmen, dass der erste Peak einer Verunreinigung und der zweite eben dem Acetophenon entspricht. Erst die Injektion von 1 μL (linkes Chromatogramm) entlarvt, dass die Verunreinigung tatsächlich „rein“, der Hauptpeak jedoch nicht homogen ist.

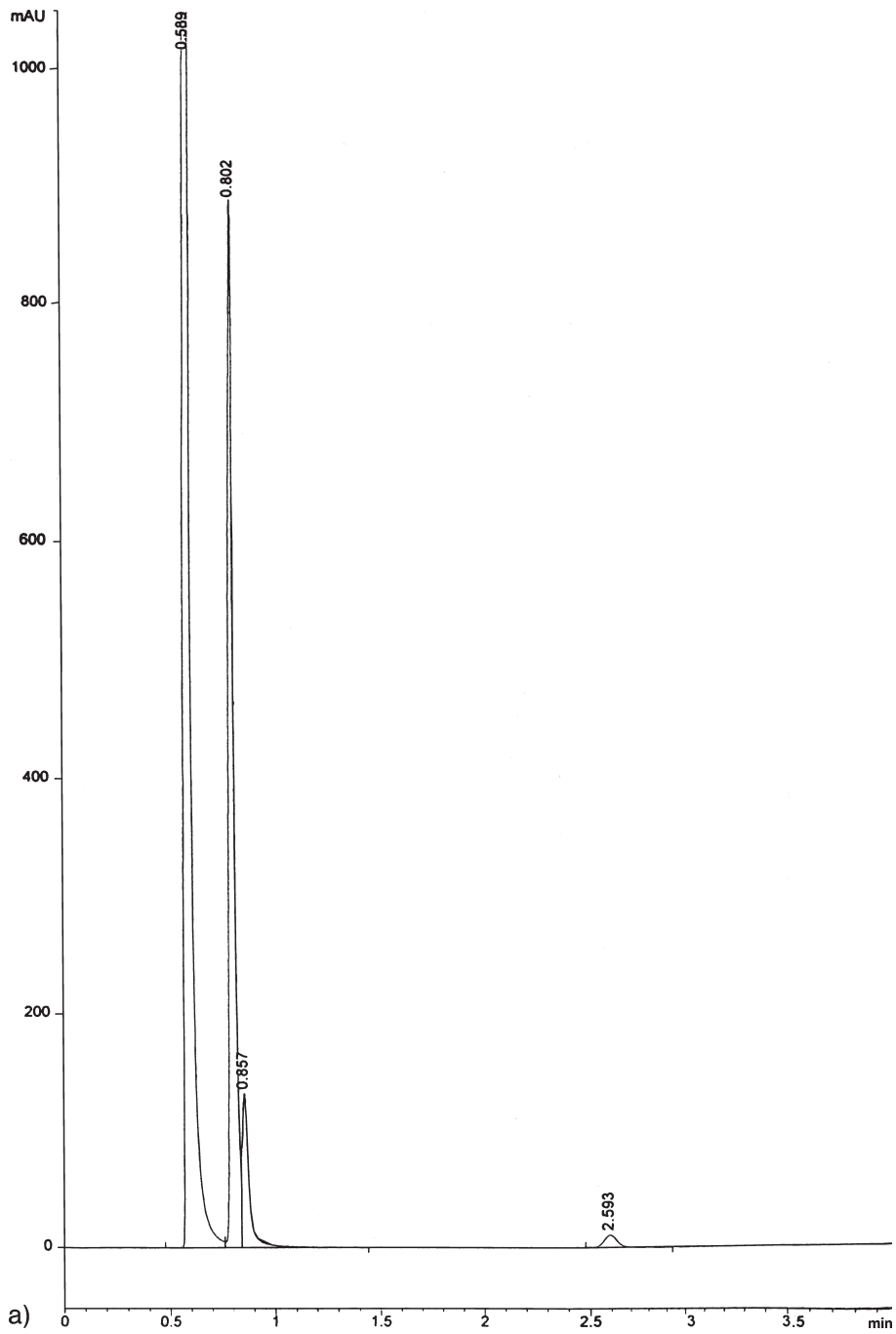


Abb. 8a Zum Einfluss der Datenrateaufnahme auf die Auflösung bei schnellen Peaks.
(a) Chromatogramm aufgenommen bei 0,1 min Peakbreite.

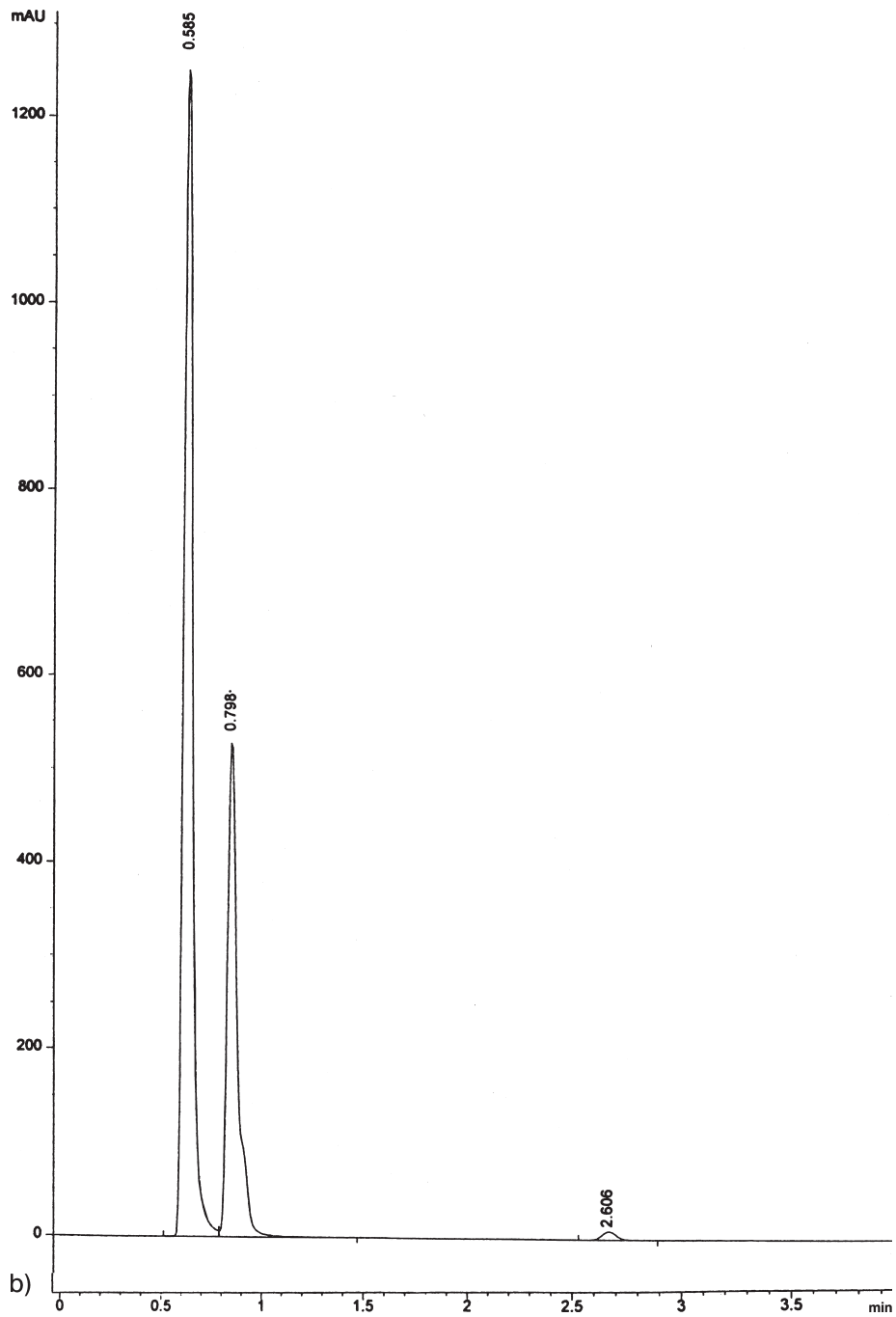


Abb. 8b Zum Einfluss der Datenrateaufnahme auf die Auflösung bei schnellen Peaks.
(b) Chromatogramm aufgenommen bei 0,01 min Peakbreite.

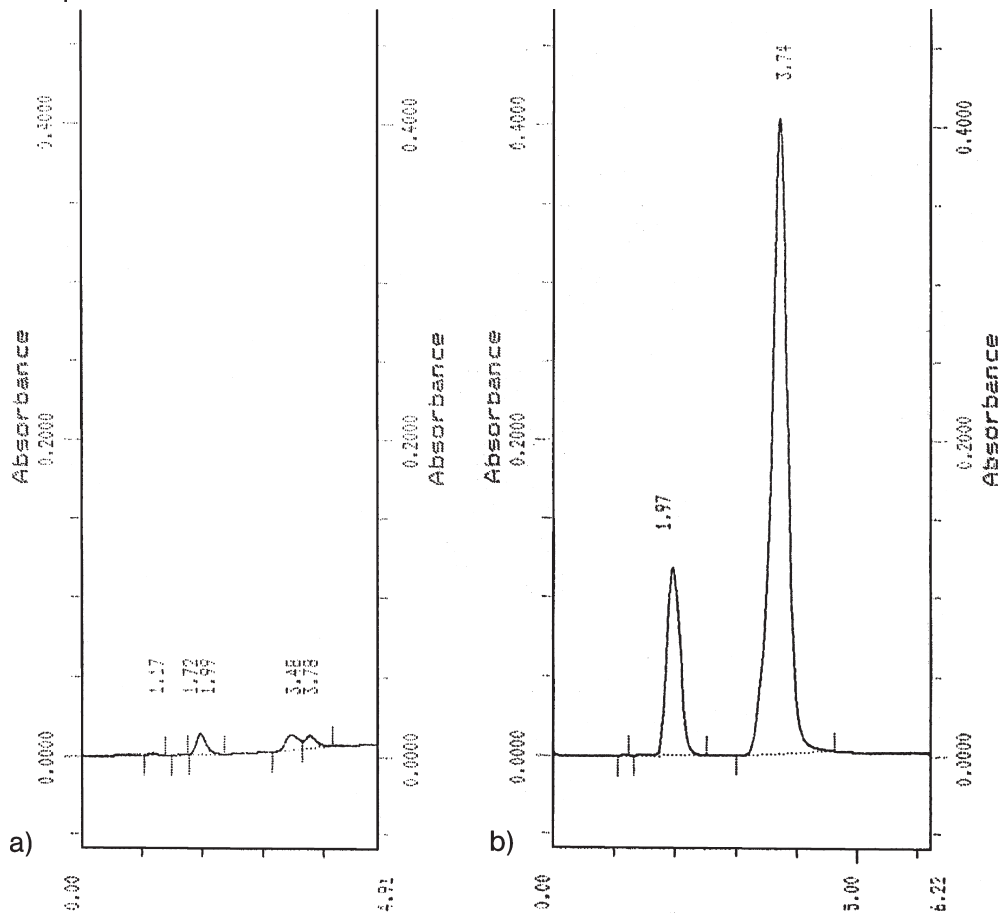


Abb. 9 Zum Einfluss des Injektionsvolumens auf die Auflösung von neutralen Komponenten; Erläuterungen siehe Text.

In Abb. 10b ist die Injektion von 20 μL Benzoesäure plus unbekannte Verunreinigung dargestellt. Die Auflösung ist äußerst dürftig. Die Injektion von 5 μL liefert eine wesentlich bessere Auflösung (Abb. 10a). Die Gefahr einer lokalen Überladung der Säule ist im Falle von polaren Komponenten besonders groß (multipler Wechselwirkungsmechanismus).

Stufe 2: Änderung von chromatographischen Parametern

Dieser Schritt umfasst die üblichen Maßnahmen, die im Rahmen einer Optimierung ergriffen werden. Hier ändert sich meist die Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase. Das Ziel ist dabei eine Änderung des Retentionsfaktors k (meist Zunahme), idealerweise auch die des Trennfaktors α .

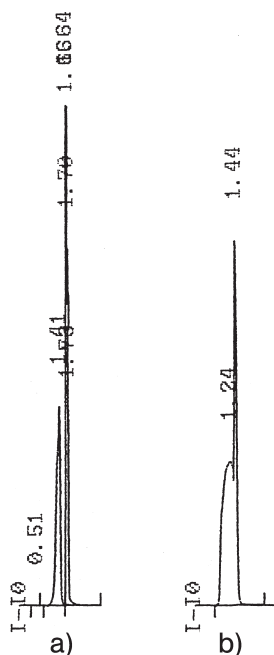


Abb. 10 Zum Einfluss des Injektionsvolumens auf die Auflösung von polaren Komponenten.

Oder aber man versucht bei konstant gehaltener Stärke der Wechselwirkung – „Chemie“ und damit auch k und α konstant –, die Bodenzahl zu erhöhen bzw. durch Miniaturisierung die Verdünnung zu verhindern oder die relative Massensensitivität zu erhöhen.

Bei einer „trial and error“-Vorgehensweise beträgt der Zeitbedarf ca. 1–2 Wochen. Durch eine systematische Vorgehensweise, evtl. mithilfe von Optimierungsprogrammen, kann die Zeit merklich reduziert werden (s. Kap. 4).

Nachfolgend einige Möglichkeiten:

1. Eluent: Zum Beispiel Änderung der Polarität, Acetonitril durch Methanol ersetzen (oder umgekehrt), Modifier wie THF, Isopropanol oder *n*-Butanol bei neutralen bzw. Amin oder Säure bei polaren/ionischen Komponenten zugeben, pH-Wert, Pufferart und/oder -stärke variieren.

2. Stationäre Phase: Die Bandbreite an kommerziell erhältlichen Säulen ist heute ein Segen und ein Fluch zugleich. Zu einigen Regeln und zu theoretischen Hintergründen bei der Auswahl von RP-Säulen s. Ausführungen in Kap. 2.1. In diesem Zusammenhang soll an die Doppelsäulentechnik erinnert werden.

Dazu ein Beispiel: Die Trennung von fünf relativ polaren Komponenten an einer Nucleosil C₁₈-Säule eignet sich kaum, Begeisterung auszulösen (s. Abb. 11). An einer CN-Säule ist die Trennung noch dürftiger (s. Abb. 12). Beide Säulen mithilfe eines Verbindungsstücks in Serie geschaltet liefern bei sonst identischen Bedingungen eine sehr schöne Trennung (Abb. 13).

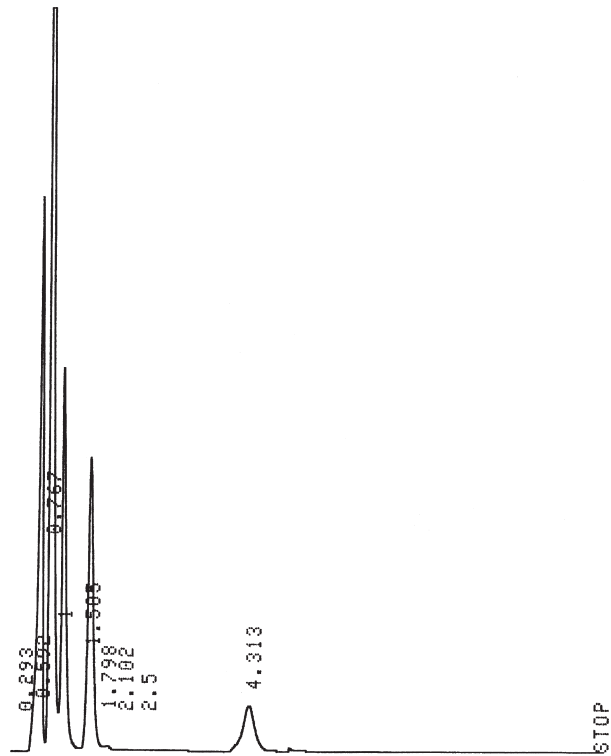


Abb. 11 Isokratische Trennung von 5 Peaks an einer Nucleosil C₁₈-Säule.

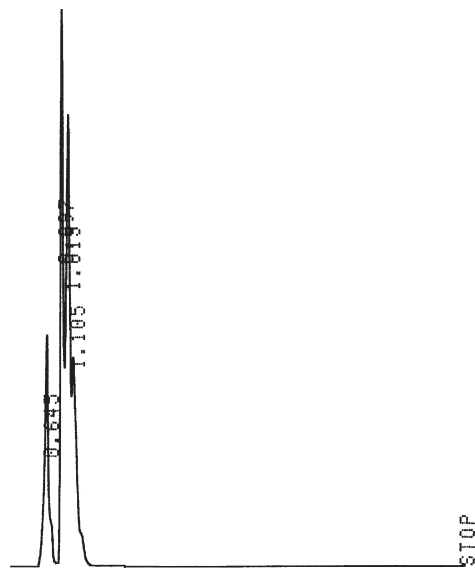


Abb. 12 Trennung wie in Abb. 11 an einer CN-Säule.

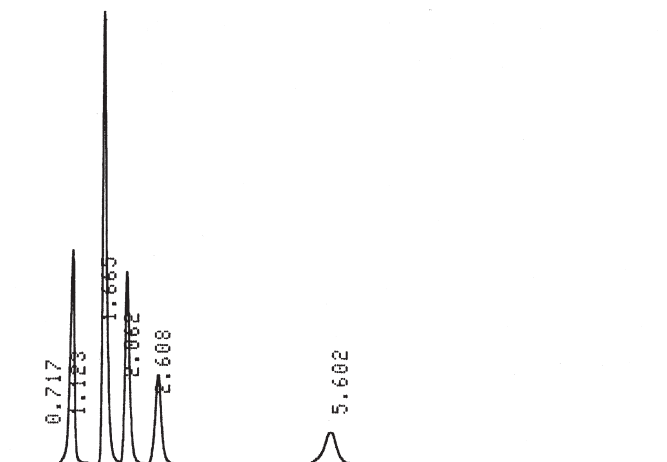


Abb. 13 Trennung wie in Abb. 11 und 12 an einer CN- und C₁₈-Säule, in Serie geschaltet.

Als Resultat kann eine bessere Auflösung vor allem im vorderen Bereich des Chromatogramms festgestellt werden. Der letzte, apolare Peak wird durch das polare CN-Material nur unwesentlich festgehalten, die geringe Verlängerung der Analysenzeit kann in Kauf genommen werden. Wir haben darüber hinaus trizyklische Antidepressiva und ihre Metaboliten (insgesamt 12 Peaks) in einem isokratischen Lauf mithilfe der Doppelsäulentechnik an Zorbax Bonus/Chromolith Performance sowie AQUA/Zorbax Extend erfolgreich trennen können.

3. Temperatur: Bei niedrigen Temperaturen dürfte der Einfluss der mobilen Phase in den Hintergrund geraten, die individuellen Eigenschaften der stationären Phasen dagegen in den Vordergrund: Die Enthalpiedifferenzen (nicht die absolute Werte!) bei der Wechselwirkung der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase sind größer als bei höheren Temperaturen. Auch die Entropiedifferenzen machen sich bei niedriger Temperatur stärker bemerkbar. Somit ist eine Differenzierung (= Selektivität) öfter einfacher.

Bei einer Erniedrigung der Temperatur nimmt die Kinetik und damit die Bodenzahl ab, die Peaks werden breiter, die Selektivität dagegen nimmt in aller Regel zu. Der letztgenannte Vorteil überwiegt beispielsweise bei Isomerentrennungen im RP-Modus oder bei Enantiomerentrennungen (s. Kap. 2.6), sodass hier bei schwierigen Trennungen die beste Auflösung häufig bei niedrigen Temperaturen beobachtet wird. In Fällen, in denen aufgrund des Mechanismus eine besonders langsame Kinetik vorherrscht, sollte bei erhöhten Temperaturen gearbeitet werden. Bei Trennungen schließlich, die weit über 100 °C durchgeführt werden, herrscht eine derartig schnelle Kinetik, dass hier mit einer sehr guten Auflösung aufgewartet werden kann.

Halten wir folgendes fest: Eine Erniedrigung der Temperatur scheint für solche Trennungen von Vorteil zu sein, bei denen der sterische Aspekt bei sonst chemischer Ähnlichkeit der zu trennenden Komponenten eine wichtige Rolle

spielt, z. B. Enantiomere, verdrillte Strukturen, Doppelbindungsisomere usw. Bei „klassischen“ RP-Trennungen jedoch sollte zunächst eine – merkliche! – Erhöhung der Temperatur in Betracht gezogen werden. Die Vorteile liegen auf der Hand: Eine Temperaturerhöhung führt zur Abnahme der Retentionszeit und des Rückdruckes; durch den zuletzt genannten Effekt können 3 oder gar 1,7–2 μm -Teilchen problemlos eingesetzt werden. Eine Verbesserung der Effizienz (höhere Bodenzahl) wird nicht nur durch den Einsatz von kleinen Teilchen sondern zusätzlich auch durch die Erniedrigung der Viskosität des Eluenten und der damit einhergehenden Erhöhung der Kinetik erreicht. So ergibt sich bei einem Fluss von 2 mL/min und 80 °C an vier Säulen zu 10 cm in Serie geschaltet die gleiche Retentionszeit wie an einer 25 cm langen Säule bei 30 °C und einem Fluss von 1 mL/min – allerdings bei einer um Faktor 4 höheren Effizienz! Darüber hinaus nimmt bei Temperatur-Erhöhung die Polarität des Eluenten ab und somit wird weniger organischer Anteil im Eluenten benötigt („grüne“ HPLC). Schließlich wird bei Verwendung von sauren Puffern die Ionisation von Basen unterdrückt. Dies führt zu einer Zunahme von hydrophoben Wechselwirkungen, und durch die sich ergebende schnellere Kinetik wird eine merkliche Verbesserung der Peakform von ionischen/ionisierbaren Spezies beobachtet.

Stufe 3: Kopplungen, orthogonale Trenntechniken

Sollte es sich beim aktuellen Trennproblem um eine wirklich wichtige, mitunter recht unbekannt Probe handeln, sollten noch sicherere Möglichkeiten zur Überprüfung der Peakhomogenität ins Kalkül gezogen werden. Da einige dieser Möglichkeiten in den nächsten Kapiteln ausführlich besprochen werden, seien sie hier nur kurz aufgeführt.

Kopplung HPLC-Spektroskopie, z. B. LC-MS(MS) (Kap. 3.3, 5.1 und 5.4), LC-NMR (Kap. 3.4).

Durch die Kopplung der HPLC mit einer spektroskopischen Methode wird naturgemäß nicht die Auflösung, sondern lediglich die Spezifität erhöht. Dennoch nimmt die Sicherheit der qualitativen Aussage enorm zu.

Orthogonale Trenntechniken (= Kombination von unterschiedlichen Trennprinzipien/Mechanismen), 2D- oder Multi-D-Chromatographie.

Durch die Kopplung zweier chromatographischer Verfahren, z. B. LC-GC, Gel-filtration-Ionenaustausch oder LC-DC (2D-Trennungen (s. Kap. 3.2), oder eines chromatographischen mit einem anderen Verfahren, z. B. Gelelektrophorese-HPLC, HPLC-ELISA (s. Kap. 3.1) oder HPLC-CE, erhöht sich die (chromatographische) Auflösung. Eine evtl. anschließende Kopplung mit der Spektroskopie, z. B. LC-GC-MS oder LC-CE-MS, führt zusätzlich zu einer Erhöhung der Spezifität.

Die Möglichkeiten der Kopplungstechnik seien hier am Beispiel der Kopplung LC-DC demonstriert:

Abbildung 14 zeigt die Gradiententrennung eines Emulgators an einer C_{18} 2 mm-Säule (Quelle: G. Burger, Bayer Dormagen): Man erhält viele, eher recht schlecht abgetrennte Peaks. Betrachten wir den letzten Peak „D“. Dieser Peak ist

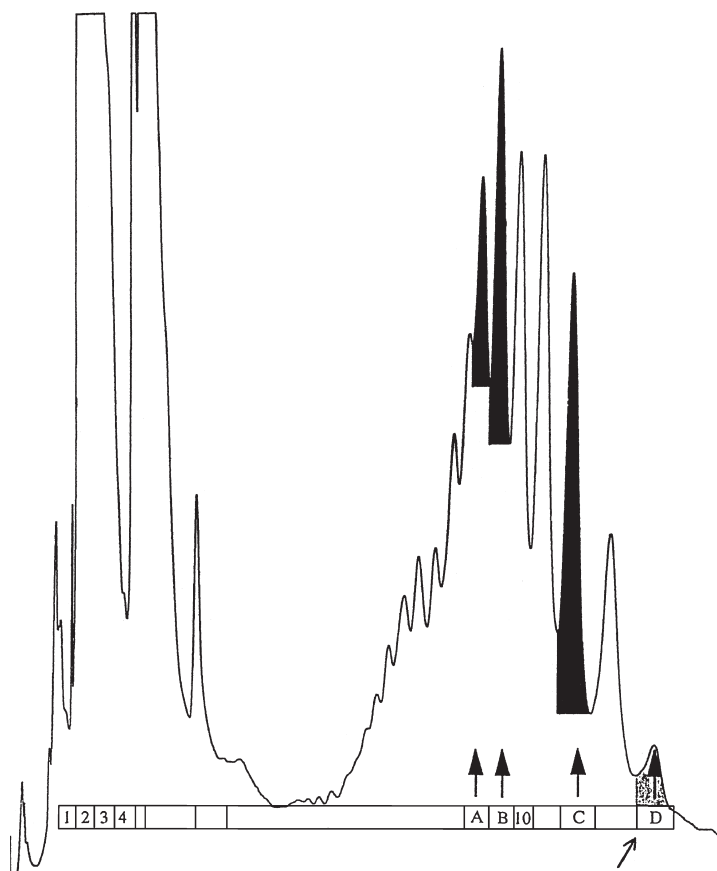


Abb. 14 Gradiententrennung eines Emulgators. Erläuterungen siehe Text.

zwar etwas breit, doch besteht nicht unbedingt ein zwingender Verdacht auf Peakinhomogenität. Wenn nun Peak D online auf eine DC-Platte aufgesprüht wird und mit dieser Fraktion eine DC-Trennung im 2D-Stufengradienten-Modus durchgeführt wird (Entwickeln, Trocknen, Entwickeln usw. und anschließend eine Entwicklung der Platte auf die gleiche Weise, allerdings um 90° gedreht), ergibt sich das Bild in Abb. 15. Ich denke, das bedarf keines weiteren Kommentars. Bei der Kopplung zweier chromatographischer Verfahren multiplizieren sich die Peakkapazitäten.

Eine „light“-Variante des orthogonalen Prinzips ist folgende: Man führt eine zweite Trennung auf einer „völlig“ anderen Trennsäule, mit einem anderen Eluenten, reduziertem Injektionsvolumen und/oder bei einer anderen Wellenlänge durch. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei oder mehrere Substanzen bei unterschiedlichen Bedingungen gleich verhalten, d. h., dass sich ein gleiches Chromatogramm ergibt, ist recht gering. Zur Säulenauswahl für orthogonale Experimente s. Kap. 2.1.1, 2.1.3 und 2.1.6.

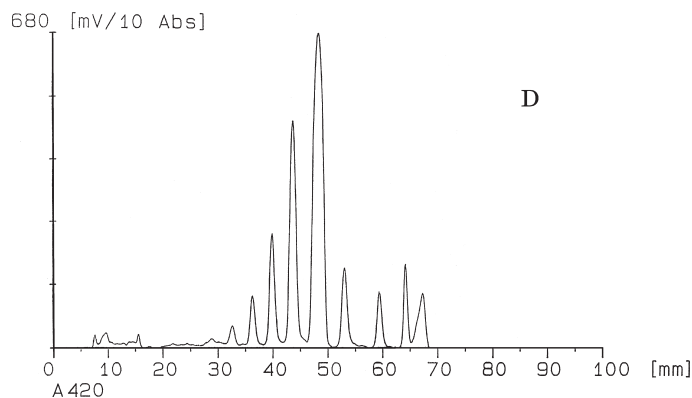


Abb. 15 Weitere Auftrennung der HPLC-Fraktion „D“ (s. Abb. 17) mittels DC. Erläuterungen siehe Text.

Beispiel: Man ist beim letzten Schritt der Optimierung angelangt. Bei der Injektion von 20 μL Probe auf eine hydrophobe Phase, z. B. Symmetry, erhält man mit einem ACN/Wasser-Eluenten und einem pH-Wert von 3 ein „gutes“ Chromatogramm. Zur Bestätigung der Peakhomogenität/Überprüfung der Selektivität verwendet man jetzt eine polare Säule, z. B. LiChrospher, einen MeOH/Wasser-Eluenten und injiziert 2 oder 5 μL . Erhält man die gleiche Anzahl von Peaks – bei wahrscheinlich unterschiedlicher Retentionszeit und unterschiedlicher Peakform – kann man davon ausgehen, dass wahrscheinlich „nichts“ übersehen wurde. Im einfachsten Fall kann bei sonst konstanten Bedingungen lediglich eine Säule mit einer anderen Oberflächen-„Chemie“ getestet werden.

Die Effektivität einer einfachen Überprüfung nach dem orthogonalen Prinzip soll an drei Beispielen demonstriert werden:

Beispiel 1

In Abb. 16c wird die Injektion einer Mischung bestehend aus Uracil, Pyridin, Benzylamin und Phenol in einem sauren Acetonitril/Phosphatpuffer (pH-Wert = 2,7) auf eine moderne, hydrophobe, endcappte Säule gezeigt.

Wüsste man nicht, dass vier Peaks zu erwarten sind, würde man nicht ohne weiteres vermuten, dass der erste, schmale, recht symmetrische Peak bei 1,1 min nicht homogen ist. Das ist er aber nicht! Es handelt sich um die zwei Basen Pyridin und Benzylamin, die koeluiieren (sogar vor der Totzeit, also ausgeschlossen sind). Wie sollte man übrigens auch erwarten, dass eine hydrophobe Phase eine ausreichende polare Selektivität aufweist, sie also polare Analyten, zu denen nun einmal Basen gehören, sicher trennen kann? Ich erlebe, vor allem im Pharmabereich, recht häufig folgende Situation: Es werden moderne, hydrophobe Phasen ob ihrer guten Peaksymmetrie für die Trennung basischer Analyte verwendet. Man ist zufrieden mit dem Chromatogramm, der Dioden-Array liefert den erhofften Matchfaktor von 990 für den Hauptpeak, also wird automa-