

# ***Schnelle Optimierung in der HPLC – ein Vorschlag***

***Stavros Kromidas, Saarbrücken***

***29. September 2009, Jena***

Ein *Konzept* für eine effektive **Methodenentwicklung** und **Optimierung** sowie zur Überprüfung der **Peakhomogenität**, der **Methodenrobustheit** und der **Säulenstabilität** in der RP-HPLC

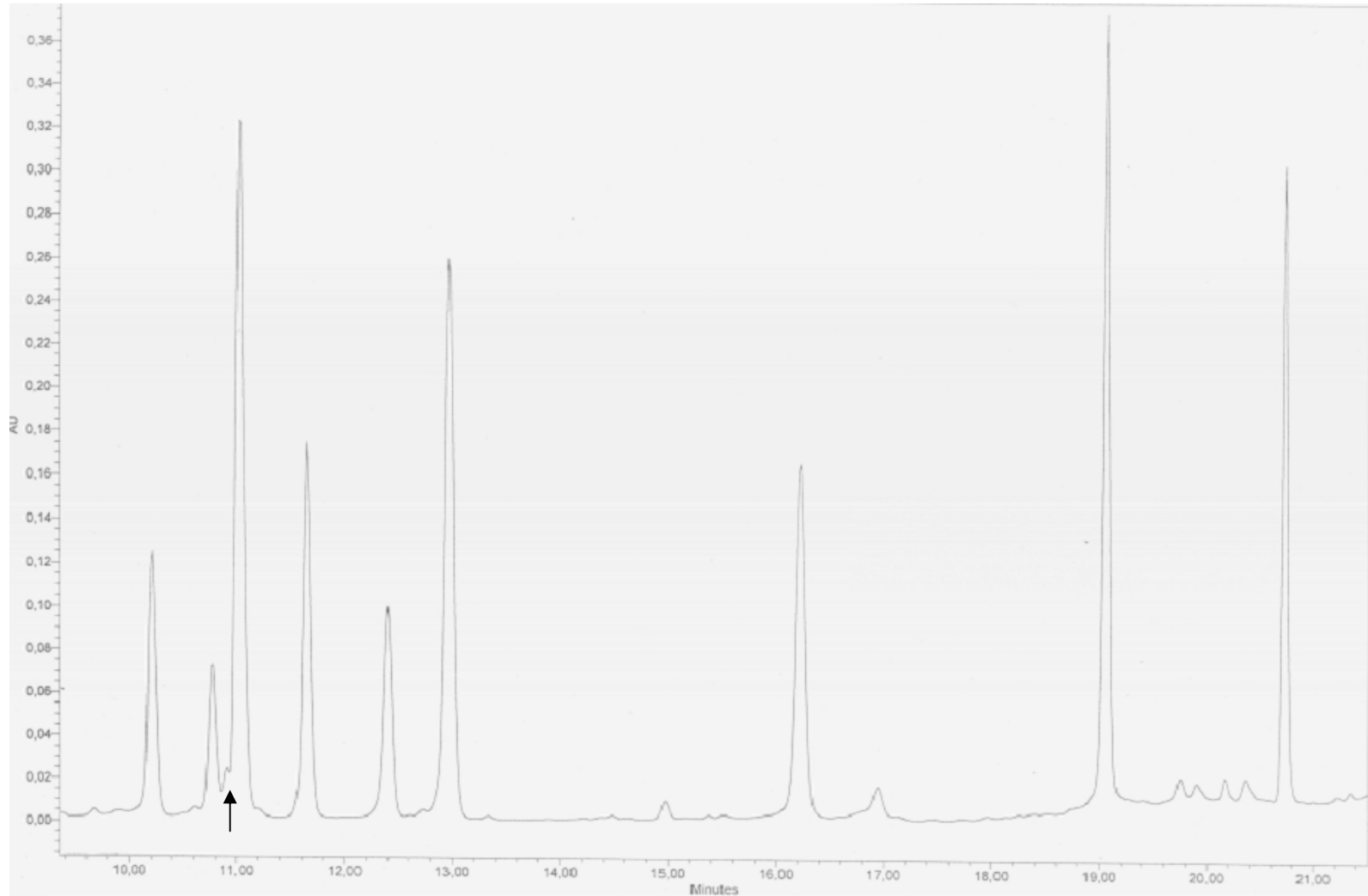
## Hardware-Voraussetzungen und Annahmen

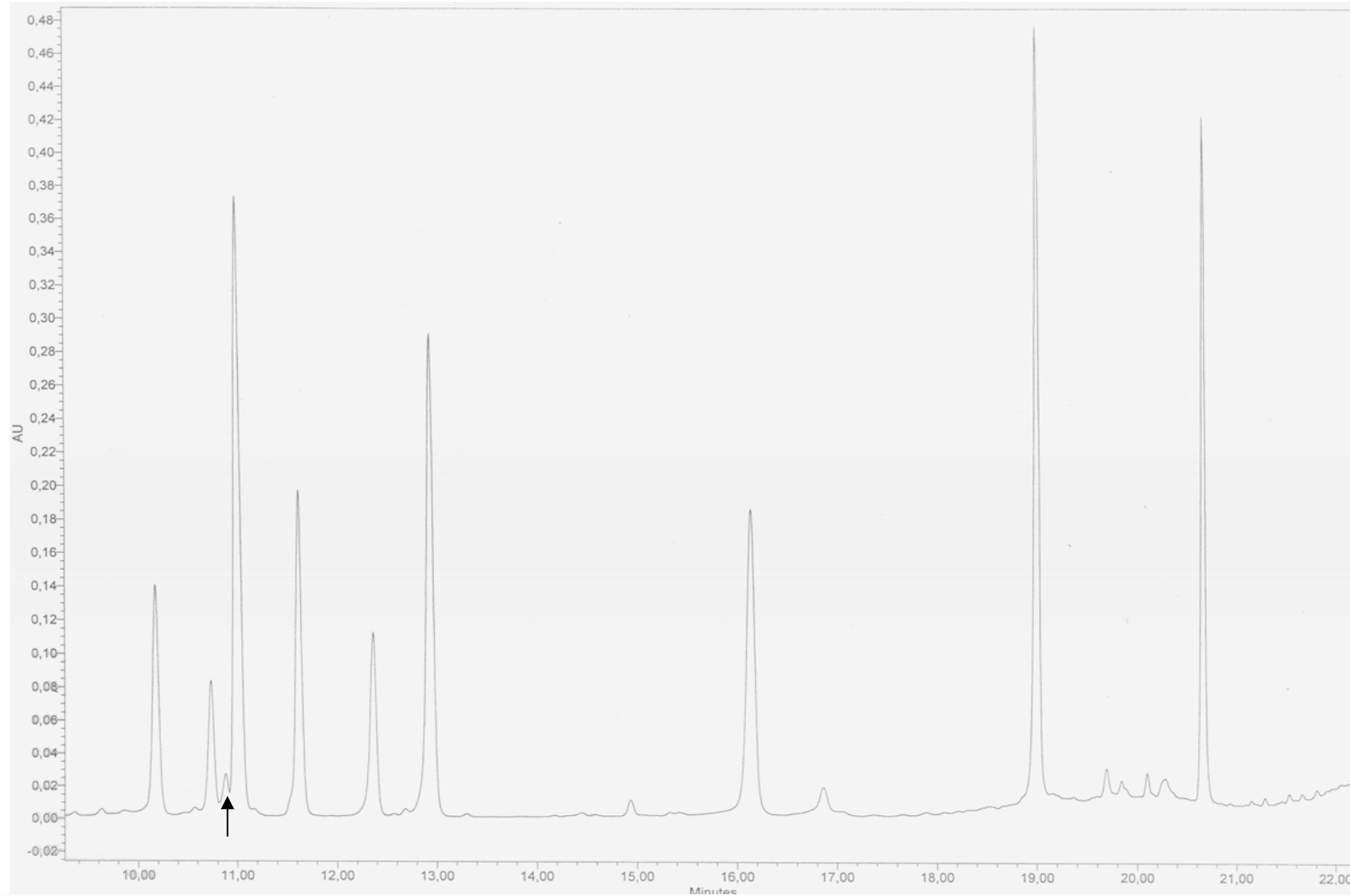
- 1. Moderne Gradientenanlage mit 3 – 4 Lösungsmittel-Eingängen, DAD, kühlbarem Säulenofen und 6-Wege Säulenschaltventil sind vorhanden - LC-MS-Kopplung ist sicherlich von Vorteil**
- 2. Es besteht keine prinzipielle Abneigung gegenüber kurzen Säulen (20 – 30 mm (50 mm), 2 – 3,5 µm) - ansonsten ändern sich die weiter unten angegebenen Zeiten**
- 3. Hier, „worst-case“-Scenario: Kaum Informationen über die Probe**

## 1. Schritt: Orientierungsversuche, Erkennen von Trends (Tagesexperimente)

Linearer Gradient (z.B. 5 → 95% ACN) bei drei pH-Werten an 6 Säulen  
**6 Säulen x 3 pH-Werte x 14 min (10 min + 4 min) ≈ 250 min ≈ 4 St.**

1. Bei der „besten“ Kombination Säule ↔ pH-Wert:  
Gleicher pH-Wert aber  $\Delta$  Säure /  $\Delta$  Base
2. 50 % ACN gegen 50% MeOH und/oder 10% THF ersetzen  
**3 Läufe x 14 min ≈ 40 – 45 min**





**Folgende Info nach einem Tag (ca. 6 – 7 Stunden):**

**An welchem Phasentyp erhält man bei welchem pH-Wert mit welchem Modifier und mit welchem organischen Lösungsmittel die größte Anzahl an Peaks.**

**Bei Bedarf, Trennungen im Alkalischen, z.B. bei pH = 10, pH = 11 und pH = 12 durchführen**

**2 Säulen x 3 pH-Werte = 6 Läufe  
(oder: 3 Säulen x 2 pH-Werte)**

**6 Läufe x 14 min  $\approx$  84 min  $\approx$  1,5 St.**

## Variante:

### 1. Grobe Auswahl Phasentyp, organisches Lösungsmittel und pH-Wert

**C<sub>18</sub>**

**Phenyl**

**Diol**

**ACN**

**pH<sub>1</sub>, pH<sub>2</sub>, pH<sub>3</sub>**

**MeOH (50%)**

**pH<sub>1</sub>, pH<sub>2</sub>, pH<sub>3</sub>**

**3 Säulen x 2 LM. x 3 pH-Werte = 18 Läufe**

**18 Läufe x 14 min ≈ 250 min ≈ 4 St.**



**2. Jetzt kann die Frage beantwortet werden: Durch welchen Parameter ergibt sich die größere Variation - pH-Wert oder Lösungsmittel?**

**A. LM? Bei konstantem pH-Wert, LM 1/LM 2 testen (+/- ca. 10%)**

**B. PH-Wert? Bei gleichem Eluenten, pH-Wert 1 / pH-Wert 2 testen (+/- 0,5 pH-Einheiten)**

**3 Säulen x 2 pH-Werte (oder 2 LM) = 6 Läufe**

**6 Läufe x 14 min  $\approx$  90 min  $\approx$  1,5 St.**

**3. Mit der „besten“ Säule beim „optimalen“ pH-Wert und dem „besten“ Lösungsmittel werden bei zwei „extremen“ Temperaturen zwei Gradienten gefahren.**

**4 Läufe x 14 min  $\approx$  60 min  $\approx$  1 St.**

**Zeitbedarf: 4 + 1,5 + 1  $\approx$  6,5 Stunden, also im optimalen Fall 1 Tag, sonst realistischerweise 1 1/2 - 2 Tage**

**Info wie oben, zusätzlich erste Infos bzgl. Einflusses des Gradienten und der Temperatur**

## 2. Schritt: Säulenauswahl (Nachtexperiment)

**SSV mit bis dato „bester“ Säule plus fünf weiteren bestücken und über Nacht mit dem „besten“ Gradienten bei  $\pm 0,5$  pH-Einheiten vom „besten“ pH-Wert fahren: 6 Säulen x 2 pH-Werte = 12 Läufe**

## 3. Schritt: Feinoptimierung, Methodenrobustheit (Tagesexperiment)

- **Vorgehensweise: Klassisch, d.h. Parameter nacheinander variieren oder mit Hilfe von Optimierungsprogrammen, also:**

**Variieren von Gradient (Anfangs-, Endbedingungen, Steigung, (Gradientenprofil,) Gradientenvolumen und Temperatur, evtl. Säulenlänge und –Innendurchmesser und Teilchengröße**

**Sinnvoll zu diesem Zeitpunkt: Methodenrobustheit – wenigstens ein wenig - überprüfen!**

**Gönnen Sie sich an dieser Stelle am besten eine Pause und halten kurz inne...**

**Nun, Sie haben innerhalb 3 – 4 Tage immerhin jede Menge Parameter getestet, die Trennung „steht“ halbwegs, das Chromatogramm sieht gut aus, die Peaks auch usw. – dieses Ergebnis könnte unter Umständen ausreichend sein. Entscheiden Sie (oder eine „wichtige(re)“ Person...), ob dies tatsächlich der Fall ist.**

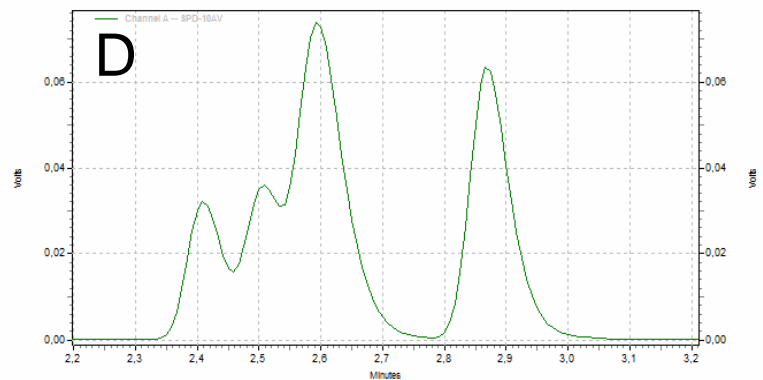
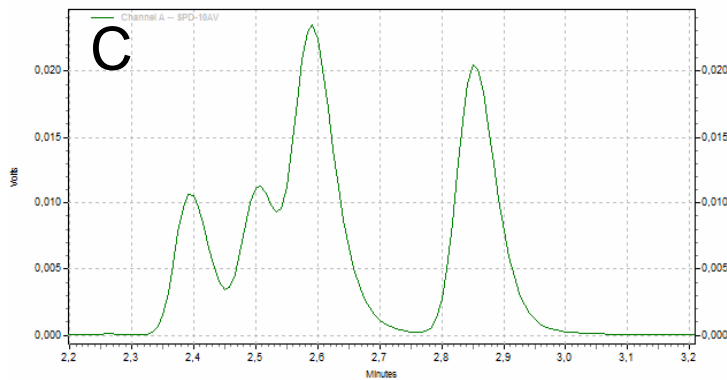
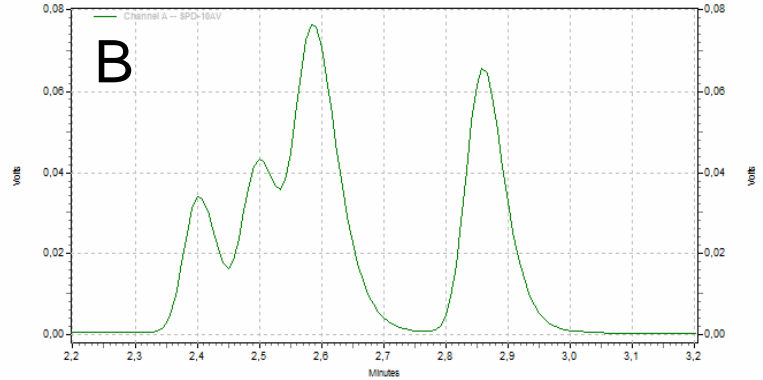
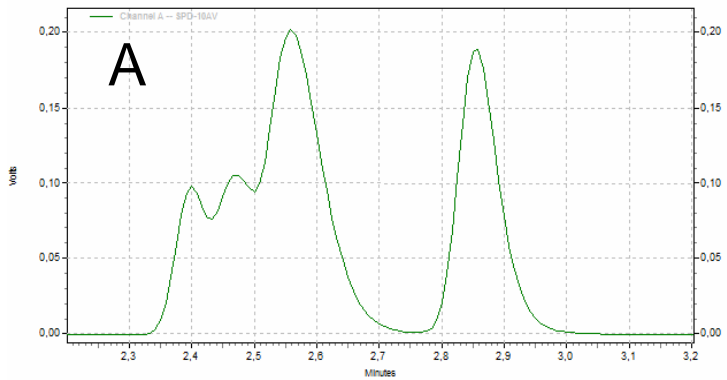
**Meinung von Kromidas:**

- 1. Geht es im konkreten Fall halbwegs um „Wahrheit“, sollte Schritt 4 folgen.**
- 2. Soll die Methode später in die Routine gehen, ist Schritt 5 mehr als sinnvoll**

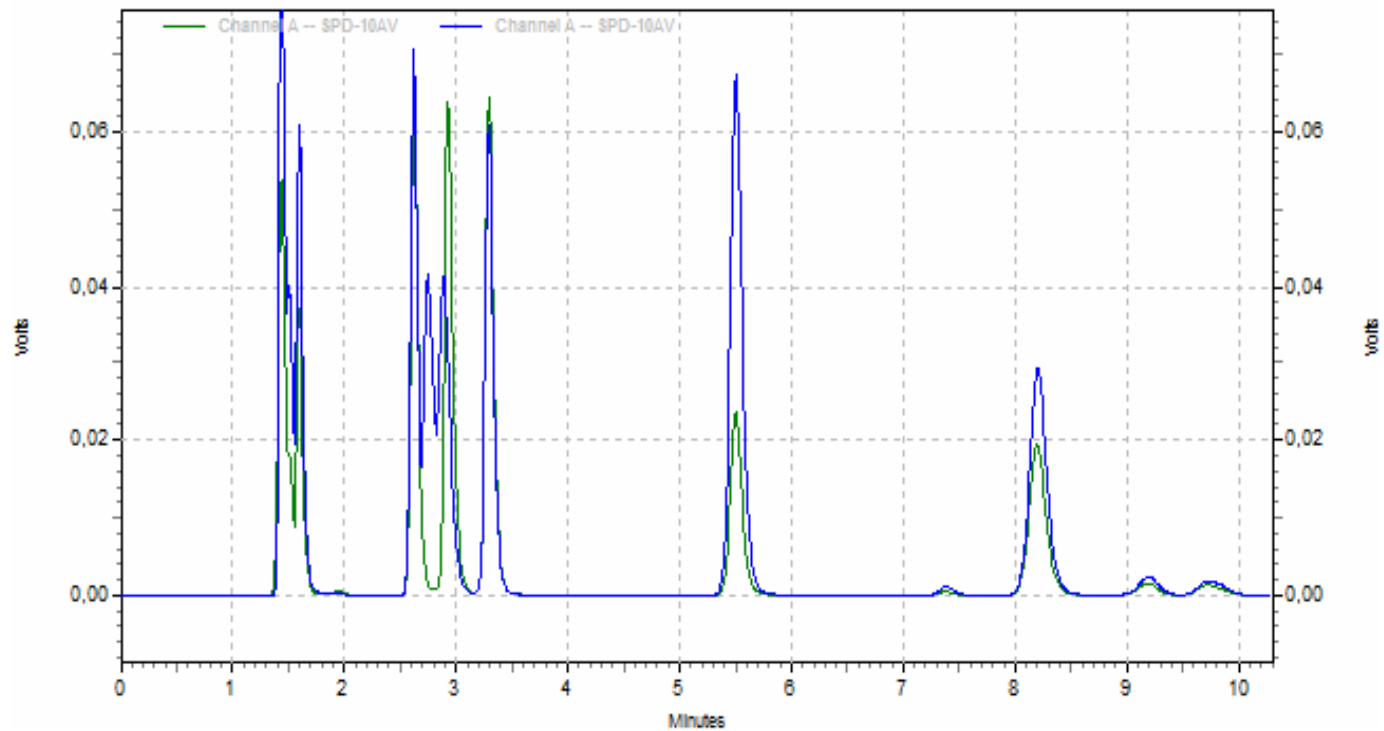
### **4. Schritt: Überprüfung der Peakhomogenität, „cross-Experimente“ (Tages/Nachtexperiment)**

- 1. Bei konstanter chromatographischer Auflösung die apparativen Möglichkeiten und „optimale“ Einstellungen nutzen (DAD, LC-MS)**
- 2. Schnelle und einfache Tests: Injektionsvolumen verringern, Probenlösung mit Eluent/Wasser verdünnen, pH-Wert der Probenlösung ändern, evtl. anderes Probenlösungsmittel testen**
- 3. Orthogonale Tests: Gleiche Säule,  $\Delta$  Eluent oder gleicher Eluent,  $\Delta$  Säule oder  $\Delta$  Eluent an einer Säule mit bifunktioneller Oberfläche**

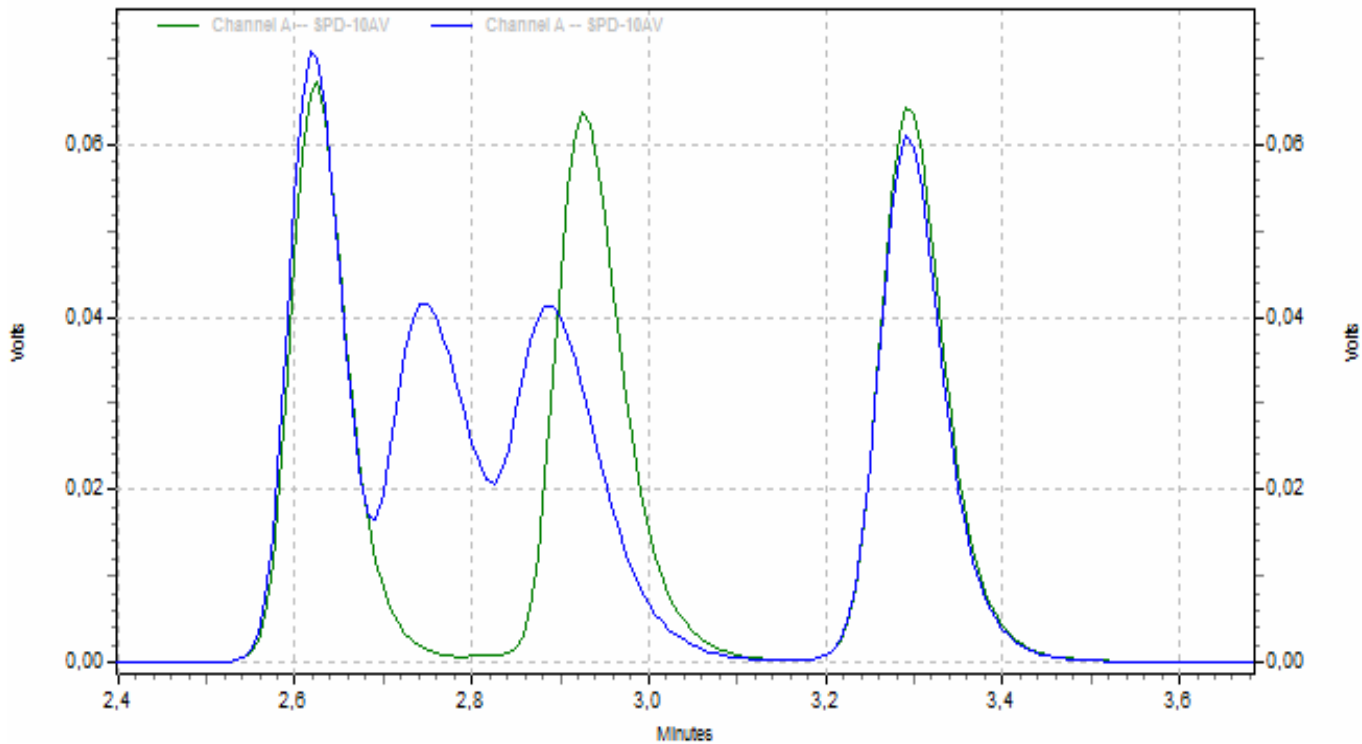
A: Probe im Eluenten, B: Verdünnung 1 : 3,  
C: Verdünnung 1 : 8, D: Wie „C“, Inj.Vol. 3 x



# Zum Einfluss des Probenlösungsmittels auf die Trennung (blau: ACN, grün: MeOH)

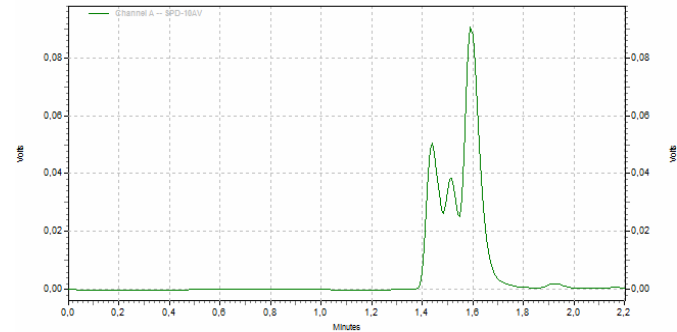


## Zum Einfluss des Probenlösungsmittels auf die Trennung blau: ACN, grün: MeOH

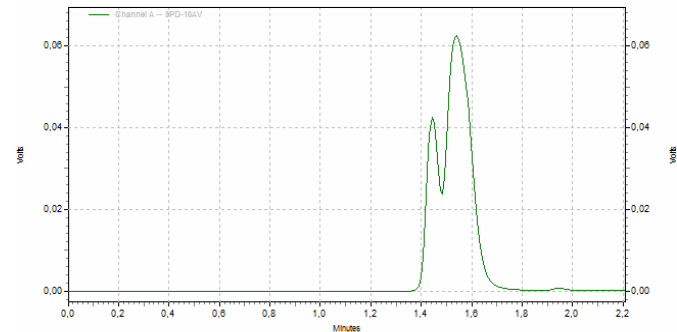




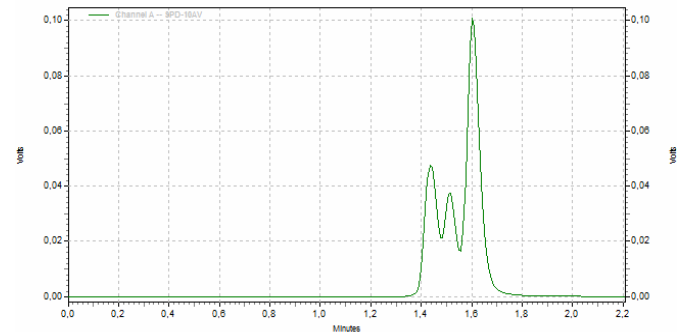
Probe im Eluenten  
gelöst (pH-Wert 2,7)



Wie oben, pH-Wert  
jedoch 1,6



Wie oben, pH-Wert  
jedoch 5,6



## 4. Haupt- bzw. kritischen Peak fraktionieren (vordere Peakflanke, Peakspitze, hintere Peakflanke) und:

- a. Drei Fraktionen einzeln injizieren
- b. Drei Fraktionen einzeln injizieren, nachdem eine zweite Säule in Serie geschaltet wurde
- c. Fraktionen mittels LC2/GC, DC oder CE untersuchen (2D-Chromatographie)
- d. Fraktionen mittels IR-, MS-, NMR-Spektroskopie untersuchen

### Empfehlung:

<b>Tests 1-3:</b>	<b>stets</b>
<b>Tests 4a-4b:</b>	<b>bei wichtigen Proben</b>
<b>Tests 4c-4d:</b>	<b>bei „wirklich“ wichtigen Proben ein „Muss“ dennoch individuell zu entscheiden</b>

## 5. Schritt: Methodenrobustheit II (Tagesexperiment), Säulenstabilität („Wochenendexperiment“)

### A. „Verträglichkeit“ Probe-stationäre Phase

- A. 1. Katalytische Wirkung des Kieselgels?
- A. 2. Irreversible Sorption von Probenbestandteilen an der stationären Phase?
  - **Peakfläche konstant?**
  - **Peakfläche mit/ohne Säule?**

### B. Einfluss des Probenlösungsmittels?

Je nachdem Variation von:

- **pH-Wert**
- **org. Anteil**
- **Matrix**
- **Luft**
- **.....**

## C. „Verträglichkeit“ Eluent-stationäre-Phase (Säulenstabilität)?

„Aggressiven“ Eluenten ein Wochenende lang über die Säule schicken und am Montag Retentionszeit, Peakfläche und Peakform bei den üblichen Trennbedingungen überprüfen.

### Beispiele (!) für „aggressive“ Bedingungen:

- hoher Wasseranteil im Eluenten (z.B. 95 – 100%)
- extremer pH-Wert (z.B. pH = 1,5 oder 9,5)
- hoher Salzgehalt im Eluenten (z.B. 50 – 100 mM)
- erhöhter Fluss (z.B. 2,5 – 3,5 ml/min)
- hohe Temperatur (z.B. 60 – 80°C)

oder im extremen Fall einige/alle diese Bedingungen simultan (50 mM, 50°C)

## D. Säulen aus 2 -3 Chargen testen – sehr wichtig!

# Das „5-Schritte-Modell“ – Aufwand und Informationsgewinn

**Zeitbedarf:** Eine Woche/10 Tage inkl. Wochenende\*

**Aufwand:** ca. 50 – 60 Läufe

**Informationen:** Folgendes hätte getestet/überprüft werden können:

- 5 pH-Werte inkl. Feinjustierung
  - 3 organische Lösungsmittel inkl. Modifier
  - 15 stationäre Phasen
  - Optimierung von Gradient und Temperatur sowie evtl. Säulendimensionierung und Teilchengröße
- 
- \* Ferner hätten fundierte Informationen über die Peakhomogenität, die Methodenrobustheit und die Säulenstabilität gewonnen werden können

## Variante 1

**Linearer Gradient, 5 pH-Werte, 6 Säulen**

**Voraussetzung: sechs Lösungsmiteleingänge**

**Kommentar:**

**Geeignet für „schwierige“ Proben mit vielen polaren/ionischen Komponenten, da ja mehr Säulen mehreren pH-Werten gegenüber gestellt werden.**

## Variante 2

**8 Gradienten, unterschiedliche Lösungsmittel, 6 Säulen**

**Voraussetzung: zwei quaternäre Pumpen**

**Kommentar:**

**Mehr Variationen an organischen Lösungsmittel an mehr Säulen.  
Geeignet für Labore mit Engpässen im Personal und für Proben mit  
vielen, eher neutralen Komponenten.**

## Infos über die Probe vorhanden?

→ gezielte Testbedingungen wählen

- **pK<sub>s</sub>-Wert bekannt? Die Experimente mit dem pH-Wert können gezielt angegangen und deren Anzahl somit reduziert werden**
- **Mangelnde pH-Stabilität bei pH = X bzw. im Lösungsmittel Y? Der pH-Wert X bzw. das Lösungsmittel Y wäre zu vermeiden**
- **Viele Verunreinigungen in geringer Konzentration zu erwarten? Man sollte 3 µm-Material vorsehen – oder noch kleiner!**
- **Komplexe Matrix vorhanden? Der Probenvorbereitung ist größte Aufmerksamkeit zu schenken, man sollte eher 5 statt 3 µm-Material verwenden**
- **Sehr viele Komponenten in komplexer Matrix zu erwarten? Von Beginn an, evtl. 2D-Chromatographie ins Auge fassen**



## Alternativen abhängig von der Zielsetzung und vom vorhandenen Equipment

**Folgende Alternativen/Varianten zum beschriebenen Konzept wären für bestimmte Fragestellungen oder in bestimmten Dienstleistungs-Laboren in Betracht zu ziehen:**

- **Vollautomatische Methodenentwicklung (DryLab, ChromSword)**
- **Superschnelle Trennungen (U(H)PLC, Fast LC etc.)**
- **Direkt Entwicklung einer schnellen LC-MS(MS)-Methode**
- **Gerade ausreichende chromatographische Selektivität (Verwendung sehr kurzer Säulen) in Kombination mit spektroskopischer Spezifität (NMR, MALDI-TOF, FTIR, Röntgenfluoreszenz)**

## Schaffe einen „ordentlichen“ Überblick der erzielten Ergebnisse !

	pH=2	pH=2	pH=5	pH=5	pH=8	pH=8
	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	THF
<b>A</b>	4	5	3	5	usw.	
<b>B</b>	0,4	0,5	0,3	0,6	usw.	
<b>C</b>	1,3	1,5	1	1,1	usw.	
<b>D</b>	gute Peakform	Drift, hoher Druck	Tailing bei Peak X	breite Peaks	usw.	

A: Anzahl der Peaks absolut

B: Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit, z. B. 4 Peaks in 10 min,  $4/10 = 0,4$

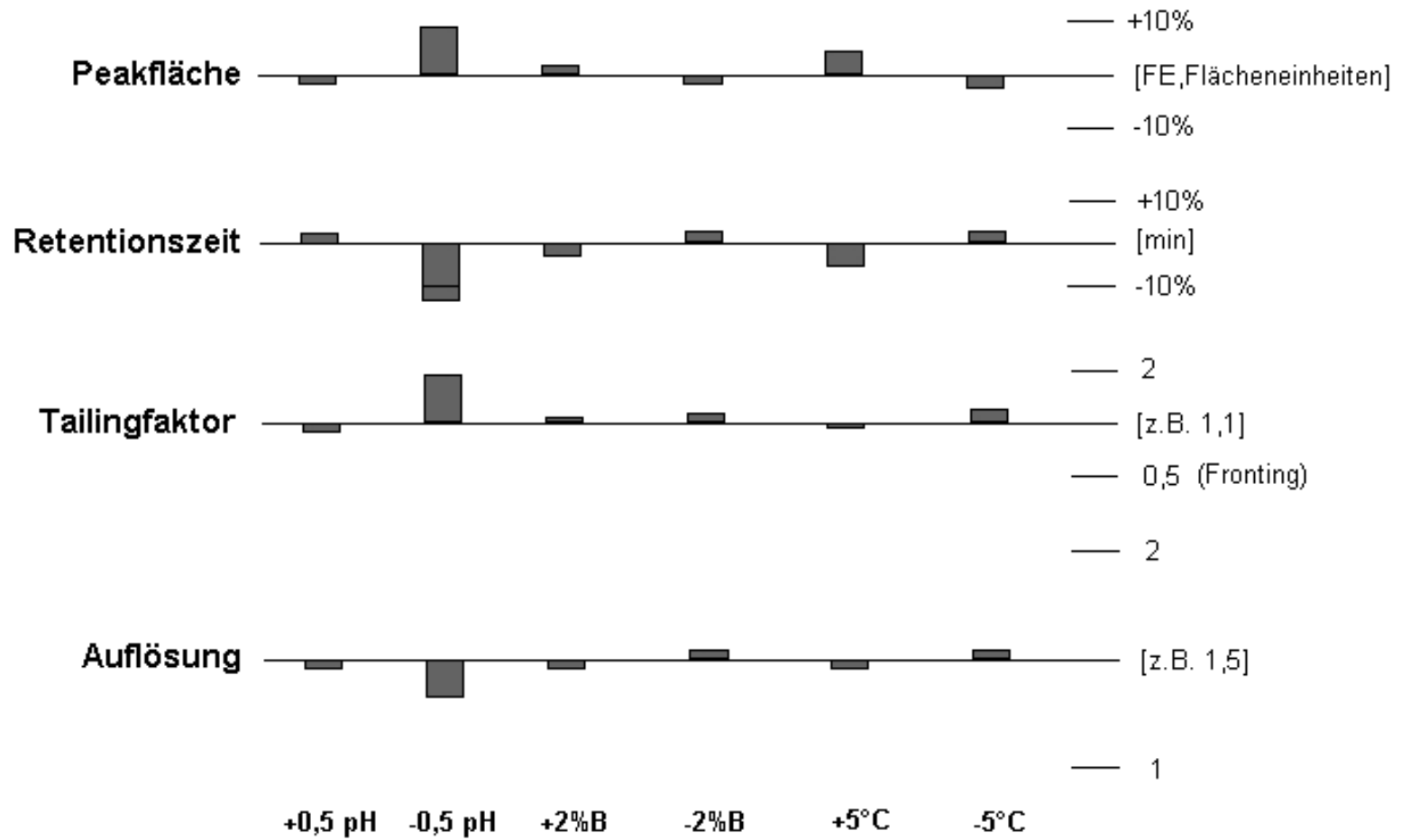
C: Auflösung des kritischen Paares

D: Kommentare, z. B., schmale Peaks, Basis-Linie-Drift, hoher Druck, tailende Peaks

usw.

E: ...

# Das „5-Schritte-Modell“ - Ergebnisüberblick (II)



**Die „Philosophie“ dahinter: Variiere systematisch (relevante) Parameter und wende dabei das Prinzip der Ökonomie an. Das bedeutet:**

- (1) - Verwende kurze Säulen, um schnell Trends zu erkennen - bei Bedarf (schwierige Matrix, „Puffer“ notwendig etc.) kannst du später immer noch eine längere Säule verwenden (Ökonomie)!**
- (2+3) - Nutze die Nacht für die Fleiß-Arbeit und mach´ die Geist-Arbeit am Tag (Ökonomie, Systematik)!**
- (4) - Traue keinem Peak – sei er auch so schmal (Relevanz)!**
- (5) - Standards sind gut, „reale“ Proben sind besser, und denk´ früh genug an die Anforderungen des Alltags (Relevanz, Ökonomie)!**

**Wenn du von allem dem,  
was diese Blätter füllt,  
Mein Leser, nichts des Dankes  
wert gefunden,  
So sei mir wenigstens für das  
verbunden, was ich zurückbehält.**

***Lessing***

Info: Einen ausführlichen Artikel zu dieser  
Thematik finden Sie unter [www.kromidas.de](http://www.kromidas.de)