Methodentransfer in der HPLC*

Zu hohen Aufwand vermeiden

Veronika R. Meyer

Manche HPLC-Analysen werden mit einem zu großen Aufwand betrieben. „Aufwand" kann verschiedenes bedeuten: zu lange Analysenzeit, unnötig große Auflösung oder zu hoher Verbrauch an mobiler Phase. In diesen Fällen könnte man die Methode optimieren. Manchmal stellen sich die gleichen Probleme, wenn die Analysen in einem anderen Labor durchgeführt werden sollen, das nicht die gleiche Auswahl an Säulen besitzt. Beim Methodentransfer sind einige physikalische Tatsachen zu beachten. Ohne ein bisschen Rechnen geht es nicht, aber mit den nachfolgenden Erläuterungen sollte dies nicht allzu schwierig sein. Dabei gibt es einfache und kompliziertere Fälle. Beginnen wir mit den einfachen.

Kürzere Säule verwenden

Für die quantitative Analyse ist bei benachbarten Peaks eine Auflösung von mindestens 1,3 notwendig, bei ungleich grossen Peaks allerdings viel mehr. Ist nun aber die Auflösung der zu quantifizierenden Peaks besser als nötig, so kann eine kürzere Säule (mit derselben stationären Phase und gleicher Packungsqualität) eingesetzt werden.

Die Auflösung R ist proportional zur Wurzel der Trennstufenzahl N, und letztere ist proportional zur Säulenlänge L_c. Es gilt also:

$$R \propto \sqrt{L_c}$$

Beispiel: Die kritische Auflösung (das heißt, die Auflösung des am schlechtesten aufgelösten Peakpaars von Interesse) beträgt aktuell 3,2, sie kann aber ohne Probleme auf 2,0 gesenkt werden. Bisher wurde eine Säule von 15 cm Länge eingesetzt.

$$\frac{R_{neu}}{R_{alt}} = \frac{\sqrt{L_{c,neu}}}{\sqrt{L_{c,alt}}}$$

$$L_{c,neu} = \frac{R^2_{neu} \cdot L_{c,alt}}{R^2_{alt}} = \frac{2{,}0^2 \cdot 15}{3{,}2^2}\ \text{cm} = \mathbf{6\ cm}$$

Man wird mit der viel kürzeren Säule Analysenzeit und Lösungsmittel sparen.

Wird bei einer bestehenden HPLC-Apparatur eine kürzere Säule verwendet, so sind die externen Totvolumina kritisch zu beurteilen. Die Peaks werden nun in einem kleineren Volumen eluiert. Falls die Apparatur vorher den Ansprüchen an das Totvolumen nur knapp genügte, so ist mit der kürzeren Säule eine übermäßige Verschlechterung der Trennstufenzahl zu beobachten. Die Volumina, welche hier eine Rolle spielen, betreffen die Injektion, die Verbindungskapillaren und die Detektorzelle, bei Gradiententrennungen auch das Verweilvolumen.

Dünnere Säule verwenden

Eine Säule mit 4,6 mm Innendurchmesser bietet keine Vorteile, sie ist aber übermäßig durstig. Mit einer Anlage, die keine speziell grossen Totvolumina aufweist (siehe oben), kann man ohne Verlust an Trennleistung, das heißt an Auflösung, auf dünnere Säulen umstellen. Damit die Retentionszeiten gleich bleiben, muss der Volumenstrom F der mobilen Phase reduziert werden, und zwar proportional zum Quadrat der beteiligten Säulen-Innendurchmesser d_c:

$$F \propto d_c^2$$

Die Autorin

Dr. Veronika R. Meyer, Jahrgang 1951: Chemikerin mit Promotion in analytischer Chemie an der Universität Bern. Habilitation 1996 und Lehrtätigkeit ebenda. Autorin von Lehrbüchern zur HPLC. Interessensgebiete sind analytische Chemie, insbesondere Chromatographie, Qualitätssicherung, Messunsicherheit (und Bergsteigen). Sie ist Projektleiterin an der EMPA St. Gallen.

*In einer ersten Version erschien der Artikel in der Schweiz. Laboratoriums-Zeitschrift 65 (2008) 57-60 des mittlerweile aufgelösten Schweizerischen Laborpersonal-Verbandes SLV.

Beispiel: Anstelle von 4,6-mm-Säulen sollen neu 3,0-mm-Säulen verwendet werden (das ist noch kein radikaler Schritt). Der bisherige Volumenstrom beträgt 1,2 ml/min.

$$\frac{F_{neu}}{F_{alt}} = \frac{d^2_{c,neu}}{d^2_{c,alt}}$$

$$F_{neu} = \frac{d^2_{c,neu} \cdot F_{alt}}{d^2_{c,alt}} = \frac{3{,}0^2 \cdot 1{,}2}{4{,}6^2}\ \text{ml/min} = \mathbf{0{,}5\ ml/min}$$

Man spart fast 60 Prozent Lösungmittel!

Kleinere Korngröße verwenden

Wechselt man bei sonst gleich bleibenden Parametern zu einer Säule mit kleinerer Korngröße, so steigen Trennstufenzahl und Druck. Die chromatographische Auflösung wird sich ein wenig verändern, weil man nun in Bezug auf die van Deemter-Kurve an einer anderen Stelle steht. Man sollte den Fluss anpassen, damit man die Vorteile der kleineren Korngröße ausnützen kann: kleinere Korngröße d_p bedingt höheren Fluss weil nun die Diffusionswege kürzer sind. Es gilt:

$$F \propto \frac{1}{d_p}$$

Beipiel: Anstelle von 5-μm-Packungen sollen in Zukunft solche von 3 μm Korngröße eingesetzt werden. Der Säulenhersteller garantiert dabei gleich gute Packungsqualität. Bisher wurde mit 1,2 ml/min gearbeitet.

$$\frac{F_{neu}}{F_{alt}} = \frac{d_{p,alt}}{d_{p,neu}}$$

$$F_{neu} = \frac{d_{p,alt} \cdot F_{alt}}{d_{p,neu}} = \frac{5 \cdot 1{,}2}{3}\ \text{ml/min} = \mathbf{2{,}0\ ml/min}$$

Wie hoch ist nun der Druck? Da kommt es darauf an, ob wir die Säulenlänge konstant lassen wollen oder aber die Trennstufenzahl (bzw. die Auflösung). Bei unveränderter Länge der Säule, was eine höhere Trennstufenzahl zur Folge hat, steigt der Druck Δp deutlich, denn es gelten die beiden Beziehungen:

$$\Delta p \propto \frac{1}{d^2_p} \qquad \Delta p \propto F$$

Beispiel: Mit der 5-μm-Phase betrug der Druck 80 bar. Nun wird eine gleich lange 3-μm-Säule verwendet. Der Fluss wird wie oben berechnet erhöht.

$$\frac{\Delta p_{neu}}{\Delta p_{alt}} = \frac{d^2_{p,alt} \cdot F_{neu}}{d^2_{p,neu} \cdot F_{alt}}$$

$$\Delta p_{neu} = \frac{d^2_{p,alt} \cdot F_{neu} \cdot \Delta p_{alt}}{d^2_{p,neu} \cdot F_{alt}} = \frac{5^2 \cdot 2{,}0 \cdot 80}{3^2 \cdot 1{,}2}\text{bar} = \mathbf{370\ bar}$$

Es macht allerdings nur dann Sinn, eine gleich lange Säule mit kleinerer Korngröße einzusetzen, wenn die Trennung vorher ungenügend war. Möchten wir die Trennstufenzahl und damit auch die Auflösung konstant halten, so können wir nun eine kürzere Säule einsetzen, denn es gilt:

$$N \propto \frac{1}{d_p} \qquad N \propto L_c$$

Beispiel: Wir wollen die kritische Auflösung bei 2,0 belassen. Bisher wurde die Trennung mit einer 12 cm langen Säule durchgeführt. Wenn die Trennstufenzahl sowohl mit der 5-μm- wie auch mit der 3-μm-Phase gleich hoch ist, so bleibt auch die Auflösung unverändert:

$$N_{neu} = N_{alt}$$

$$\frac{L_{c,neu}}{d_{p,neu}} = \frac{L_{c,alt}}{d_{p,alt}}$$

$$L_{c,neu} = \frac{L_{c,alt} \cdot d_{p,neu}}{d_{p,alt}} = \frac{12 \cdot 3}{5}\ \text{cm} = \mathbf{7\ cm}$$

Beispiel einer HPLC-Apparaur (von links): Eine Pumpe, die einen Gradienten aus zwei verschiedenen Lösungsmitteln herstellt, eine Stahlsäule und ein Apparat zur Messung der Absorption (Abb.: Kjaergaard).

Die neue Säule ist um den Faktor 3:5 = 0,6 kürzer. Damit ist auch der benötigte Druck nur noch 0,6 mal so hoch wie mit der Säule in Originallänge. Oben wurde eine Druckerhöhung um das 4,6-fache berechnet (was 370 bar ergab); mit der kürzeren Säule, welche die ursprüngliche Auflösung bietet, beträgt der Druck noch 370·0,6 bar = 220 bar.

Eine Verkleinerung der Korngröße wird immer mit einer bedeutenden Druckerhöhung „bezahlt“. Dies ist auch dann der Fall, wenn man die Flussrate nicht dazu passend erhöht, wie man es den kürzeren Diffusionsstrecken entsprechend tun sollte. Die Zusammenhänge stellen sich wie folgt dar:

Pumpendruck ausnützen

Dieses Szenario bedeutet nun die hohe Schule des Methodentransfers.

Will man eine Trennung schneller durchführen, so kann man einfach die Flussrate erhöhen. Der Druck wird proportional ansteigen, wie man aus der täglichen Arbeit mit HPLC bestens kennt. Damit verschenkt man (in der Regel) aber chromatographische Auflösung, weil man sich vom van Deemter-Optimum entfernt. Die Analysenzeit sinkt und die benötigte Menge an mobiler Phase bleibt konstant.

Um die Auflösung unverändert auf die neuen Bedingungen transferieren und erst noch effizienter arbeiten zu können, sollte man gleichzeitig die Korngröße verkleinern, den Fluss erhöhen und eine kürzere Säule verwenden. Der Druck nimmt zu, die Analysenzeit sinkt jedoch um den gleich großen Faktor und die Trennung benötigt weniger mobile Phase. Die Strategie „kleinere Korngröße, kürzere Säule“ bietet demnach einen echten Mehrwert aus dem zur Verfügung stehenden Druck, weil man an Eluent einspart. Für diese Art des Methodentransfers muss man mit der Wurzel der relativen Druckerhöhung DE rechnen:

Tabelle: Veränderung der Parameter, wenn der Druck verdoppelt werden kann. Der Säulendurchmesser bleibt unverändert.

Parameter	ursprünglich	simpel: doppelter Fluss	raffiniert: Druck ausnützen
Druck	100 bar	200 bar	200 bar
Fluss	1 ml/min	2 ml/min	1,4 ml/min
Zeitbedarf	10 min	5 min	5 min
Korngröße	5 µm	5 µm	3,5 µm
Säulenlänge	15 cm	15 cm	11 cm
totales Volumen	20 ml	20 ml	14 ml
Auflösung		nimmt ab	bleibt gleich

$$DE = \frac{\Delta p_{neu}}{\Delta p_{alt}}$$

Die neue Korngröße erhält man mit:

$$d_{p,neu} = \frac{d_{p,alt}}{\sqrt{DE}}$$

Damit ist der neue Volumenstrom vorgegeben; wie oben erläutert beträgt er:

$$F_{neu} = \frac{d_{p,alt} \cdot F_{alt}}{d_{p,neu}} = \sqrt{DE} \cdot F_{alt}$$

Die Länge der neuen Säule mit kleinerer Korngröße erhält man analog wie die neue Korngröße:

$$L_{c,neu} = \frac{L_{c,alt}}{\sqrt{DE}}$$

und wenn der Säulendurchmesser unverändert bleibt, so gilt für die Ersparnis an Eluentenvolumen V:

$$\frac{V_{total,neu}}{V_{total,alt}} = \frac{L_{c,neu}}{L_{c,alt}} = \frac{1}{\sqrt{DE}}$$

In der Tabelle ist ein Beispiel mit einer Verdoppelung des Drucks gezeigt ($\sqrt{DE} = \sqrt{2} = 1{,}4$). Die berechneten Zahlen wird man runden und sich im übrigen danach richten, welche Säulendimensionen und Korngrößen käuflich sind.

Bei gleichzeitiger Änderung von Säulenlänge und Korngröße gilt für das Druckverhältnis:

$$\frac{\Delta p_{neu}}{\Delta p_{alt}} = \frac{d_{p,alt}^2 \cdot L_{c,neu} \cdot F_{neu}}{d_{p,neu}^2 \cdot L_{c,alt} \cdot F_{alt}}$$

Diese Beziehung gilt immer und unabhängig davon, ob man die Trennung in Richtung Druckoptimierung verändert, wie beschrieben, oder ob man eine zufällige oder sogar unsinnige Veränderung von einem oder mehreren Parametern vornimmt.

Will man zudem auch noch eine dünnere Säule einsetzen, so muss die Flussrate wie bereits erwähnt gleich nochmals verkleinert werden:

$$F_{neu} = \frac{d_{c,neu}^2 \cdot F_{alt}}{d_{c,alt}^2}$$

Robustheit beachten

Bei Optimierungen und Transfers ist der Robustheit gebührende Beachtung zu schenken. Eine Methode ist robust, wenn sie auch bei kleinen Schwankungen der Bedingungen (beispielswei-

se von Temperatur oder pH-Wert) konstante Ergebnisse liefert. Wird etwa die Auflösung bei der Methodenentwicklung auf den kleinstmöglichen Wert verkleinert, der noch vertretbar ist, so wird sich die Trennung wegen der unvermeidlichen Alterung der Säule über kürzere oder längere Zeit verschlechtern und die Anforderungen nicht mehr erfüllen. Ein bisschen Reserve bei der Auflösung ist bei allen freigegebenen Methoden dringend zu empfehlen.

Muss neu validiert werden?

Nach dem Transfer einer vorgängig validierten Methode muss in der Regel nicht wieder validiert werden. Es genügt, dass der Systemeignungstest erfüllt wird. Die Transferschritte und die dahinter stehenden Überlegungen müssen zudem dokumentiert und erklärt worden sein, damit der Transferprozess nachvollziehbar ist. Kalibrierkurven oder Responsefaktoren müssen selbstverständlich neu bestimmt werden! Es wäre vollkommen falsch, sie einfach zu übernehmen – wie es überhaupt falsch ist, quantitative Analysenserien ohne aktuell ermittelte Kalibrationen durchzuführen.

Und die stationäre Phase?

Bei stationären Phasen mit genau gleichem Handelsnamen kann man davon ausgehen, dass ihre chromatographischen Eigenschaften unabhängig von der Korngröße sind. Man kann beim Wechsel von 5 μm auf beispielsweise 3 μm nahezu oder völlig identische Trennungen erwarten. Das gilt nicht mehr, wenn ein anderes Material eingesetzt wird. Bereits eine Änderung der Porenweite wirkt sich im Chromatogramm aus. Ein anderes Fabrikat, selbst mit einem ähnlichen Namen wie „RP-18“ kann ganz andere Eigenschaften aufweisen. Wenn man demnach mit der Selektivität der gewählten stationären Phase zufrieden ist, gibt es keinen Grund, eine andere Phase zu wählen. Dies würde nicht mehr als „Methodentransfer“ bezeichnet. Vielmehr wäre das eine neue Methode, die wieder validiert werden müsste.

Gradiententrennungen

Will man die Säulendimensionen oder die Korngröße von Gradiententrennungen ändern, so ist je nach Situation dem Gradientenprofil Beachtung zu schenken. Vereinfacht gesagt sind die drei besprochenen Szenarien zu unterscheiden.

Kürzere Säule: Die Analysenzeit ist jetzt auch kürzer und die Laufzeit des Gradienten muss proportional angepasst werden.

Dünnere Säule: Die Laufzeit des Gradienten bleibt unverändert, die Flussraten der beiden Eluenten müssen zusammen dem berechneten F_{neu} entsprechen.

Kleinere Korngröße: Wie dargelegt sollte man gleichzeitig den Fluss erhöhen. Zudem ist das Szenario „kürzere Säule“ attraktiv, das heißt das beschriebene Vorgehen „Pumpendruck ausnützen“. Der Gradient muss steiler gelegt werden, damit innerhalb des berechneten V_{total} die Endbedingungen erreicht sind.

Bei Gradiententrennungen spielen mehr Parameter eine Rolle als bei isokratischen Trennungen. Die untersuchten Proben sind komplexer zusammengesetzt (sonst wäre eine Gradiententrennung nicht nötig). Es ist deshalb zu überlegen, ob bei einem derartigen Methodentransfer eine Neuvalidierung nötig ist oder ob man sich wirklich nur mit dem Systemeignungstest zufrieden geben darf. ***CLB***

Literatur

Davy Guillarme, Jean-Luc Veuthey, Veronika R. Meyer, Method Transfer in HPLC, LC GC Europe 21 (2008) 322-327.

Veronika R. Meyer, The clever use of pressure in column liquid chromatography, Chromatographia 72 (2010) 603-609.