Computerunterstützte Methodenentwicklung in der HPLC



Bild: SIM

1 Ermöglicht die Nutzung der Temperatur als aktiven Parameter in der Flüssigchromatographie: Der HT-HPLC-200-Säulenofen von SIM.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Verfahren entwickelt, für die eine Temperaturgradientenelution in der Flüssigchromatographie unumgänglich ist. Lesen Sie, wie bereits existierende Retentionsmodelle angepasst werden können, um HPLC-Methoden mittels Temperaturgradientenelution unter isokratischen Bedingungen zu entwickeln.

Steffen Wiese*,**, Thorsten Teutenberg*, Torsten C. Schmidt**, Hans-Jürgen Rieger*** und Imre Molnar***

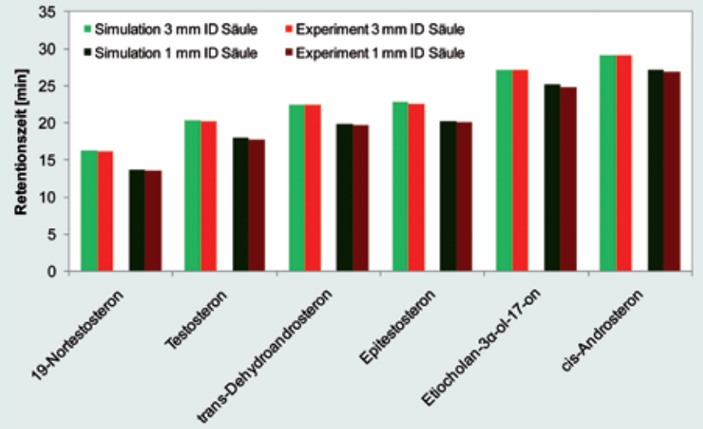
Die Methodenentwicklung in der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) wird in der Regel als Trial-and-error-Verfahren betrieben. Der Anwender im Labor verändert auf Grundlage seiner Erfahrungen verschiedene Parameter mit dem Ziel, sein chromatographisches Trennproblem zu lösen. Diese Vorgehensweise ist sowohl zeit- als auch kostenintensiv. Die Grundlagen der Gradientenelution in der HPLC wurden bereits 1980 durch Snyder beschrieben [1, 2]. Die Methodenentwicklung sollte deshalb systematisch durchgeführt werden, wobei kommerzielle Softwarelösungen wie Drylab [3] genutzt werden können. Mithilfe dieser Software kann das Retentionsverhalten der Analyten in Abhängigkeit verschiedener chromatographischer Parameter modelliert werden. Häufig werden z.B. die Gradientendauer t_G und Temperatur T oder die Lösungsmittelstärke Prozent B und der pH-Wert der mobilen Phase simultan optimiert. Ziel eines gemeinsamen Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für Energie- und Umwelttechnik sowie dem Molnár-Institut für angewandte Chromatographie war, das durch Snyder vorgestellte Modell weiterzuentwickeln. Notwendig wurde dies, weil innerhalb der letzten Jahre der Parameter Temperatur eine immer stärkere Bedeutung in der Flüssigchromatographie gewinnt. Eine ganze Reihe spezieller Kopplungstechniken erfordern z.B. die Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase [4-6].

Temperaturgradienten in der HPLC

Um die Temperatur als aktiven Parameter in der Flüssigchromatographie zu nutzen, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Zum Einen wird für die Temperierung von mobiler und stationärer Phase ein Hochtemperatur-Säulenofen benötigt. Dieser muss in der Lage sein, die mobile Phase vor dem Eintritt in die Trennsäule vorzuheizen. Des Weiteren ist es erforderlich, die mobile Phase nach Verlassen der Trennsäule auf eine definierte Temperatur herunterzukühlen. Ein derart konzipiertes Heizsystem wurde in Kooperation mit dem IUTA entwickelt und wird nun durch die Firma SIM (Scientific Instruments Manufacturer GmbH, Oberhausen) unter der Modellbezeichnung HT-HPLC-200-Säulenofen vertrieben (s. Abb. 1) [10, 11]. Dieses modular aufgebaute System besteht aus einer Eluentenvorheizung, der Säulenbeheizung und der Eluentenkühlung. Jedes dieser Module kann separat gesteuert und programmiert werden. Das Heizsystem arbeitet in einem Temperaturbereich von 30 bis 200 °C. Darüber hinaus ist dieser Säulenofen auch in der Lage, Temperaturgradienten mit einer Heizrate von bis zu 30 °C/min zu generieren, sowie innerhalb kurzer Zeit auf die Starttemperatur zu kühlen.

Eine weitere Voraussetzung für den Routineeinsatz der Hochtemperatur-HPLC ist die Temperaturstabilität der stationären Phase. Zurzeit sind nur wenige Trennsäulen kommerziell verfügbar, die eine hinreichende Temperaturstabilität besitzen. Neben den schon seit vielen Jahren kommerziell verfügbaren metalloxidischen Trennsäulen auf Basis von Titan- oder Zirkoniumdioxid stehen nun auch Hybridmaterialien auf Basis von Siliziumdioxid zur Verfügung, die aufgrund ihrer sehr guten Temperaturstabilität bei hohen Temperaturen über 100 °C eingesetzt werden können [12, 13]. Besonders hervorzuheben ist z.B. die Temperatur- und pH-Stabilität der Waters-BEH-Materialien.

Es stellt sich nun die Frage, warum die Anwendung von Temperaturgradienten in der Flüssigchromatographie notwendig ist. Wie bereits anfangs erwähnt, basieren eine Reihe neuer Kopplungstechniken auf der Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase. Um eine Elution aller in einer Probe enthaltenen Substanzen zu ermöglichen, muss die Elutionskraft der mobilen Phase während des chromatographischen Laufes erhöht werden. Da keine Lösemittelgradientenelution angewendet werden kann, ist die einzige Möglichkeit die Temperaturgradientenelution. Bislang war es jedoch mit keiner Software möglich, das Retentionsverhalten der Analyten in Abhängigkeit eines Temperaturgradienten in der Flüssigchromatographie zu modellieren. Jedoch konnte die Arbeitsgruppe Snyder zeigen, dass das Linear-Solvent-Strength-Modell (LSS) erfolgreich auf programmierte Temperaturgradienten in der Gaschromatographie (GC) angepasst und angewendet werden konnte [14]. Dieses Modell, das als Linear-Elution-Strength-Modell (LES) bezeichnet wurde, soll nun auf Temperaturgradienten in der Flüssigchromatographie angewendet werden.



Bilder: IUTA

2 Vergleich von simulierten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Steroide in Abhängigkeit vom Säuleninnendurchmesser.

Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zur HPLC erfolgt die Elution in der GC ausschließlich im Temperaturgradientenmodus. Dabei ist zu beachten, dass die Änderung der Temperatur in der GC aufgrund der geringen Innendurch-

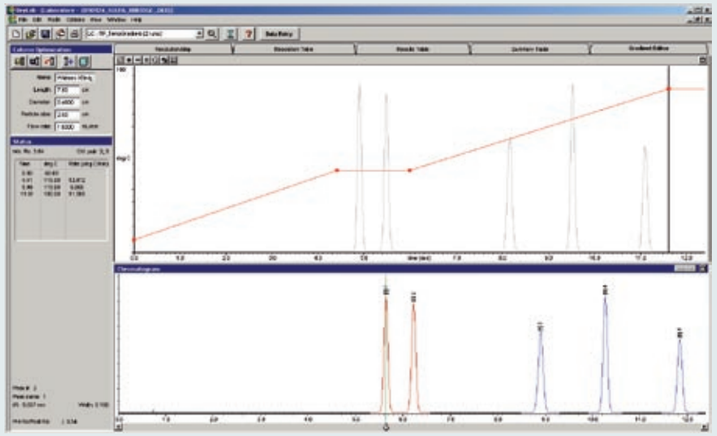
HINTERGRUND: HOCHTEMPERATUR-HPLC

Umkehrphasen mit rein wässrigen Eluenten

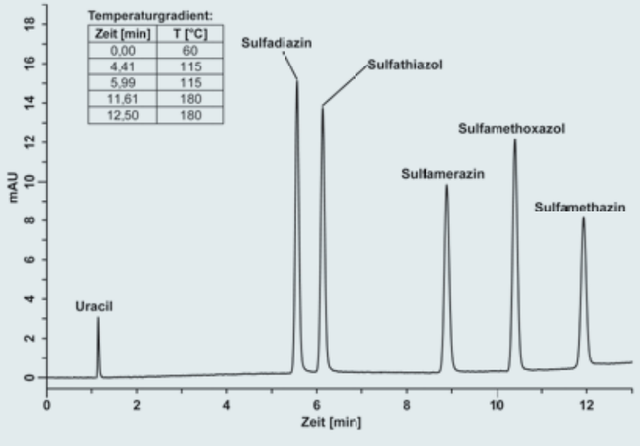
HPLC-Trennungen auf Umkehrphasen mit einem rein wässrigen Eluenten wurden bereits von Molnár und Horváth im Jahre 1976 beschrieben [7, 8]. Bei dieser Trenntechnik, die damals unter der Bezeichnung Neat Aqueous Reversed Phase Chromatography (NARP) bekannt war, wird der Effekt ausgenutzt, dass Wasser mit zunehmender Temperatur immer unpolarer wird [9]. Dadurch ist es möglich, auch sehr unpolare Substanzen, z.B. Steroide, ohne den Zusatz eines organischen Modifiers von einer Umkehrphase (RP) zu eluieren. Heutzutage ist die Technik hauptsächlich unter dem Begriff Hochtemperatur-HPLC bekannt. Dabei erstreckt sich der Temperaturbereich von ca. 60 °C bis 200 °C.

*Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., 47229 Duisburg, Tel. +49 (0) 2065 / 418-179
**Universität Duisburg-Essen, Fakultät für Chemie/IAC, 47048 Duisburg
***Molnár-Institut, 10407 Berlin

messer der verwendeten Trennsäulen unmittelbar wirkt. In der LC ist nun vorstellbar, dass aufgrund der üblicherweise verwendeten Trennsäulen mit einem Innendurchmesser zwischen 2,1 und 4,6 mm die am Heizsystem eingestellte Temperatur das Säulenbett mit einer gewissen Verzögerung erreicht. Der Grund dafür ist die Ausbildung von radialen Temperaturgradienten. Wird also ein Heizsystem verwendet, bei dem die programmierte Temperatur nicht der tatsächlichen Temperatur in der Trennsäule entspricht, wie dies z.B. häufig bei konventionellen Luftöfen ohne Eluentenvorheizung der Fall ist, ist im Rahmen der Retentionsmodellierung der Analyten eine temperaturabhängige Verzögerungszeit zu berücksichtigen. Um diese zu ermitteln, wäre es sinnvoll, direkt die tatsächliche Temperatur in der Mitte des Säulenbettes zu messen. Dies ist jedoch in einem Hochdrucksystem bei Temperaturen von bis zu 200 °C experimentell nur schwer zu realisieren. Die Evaluierung, ob eine temperaturabhängige Verzögerungszeit berücksichtigt werden muss, kann auch über die Simulation von Temperaturgradienten erfolgen. Dazu wurde ein Gemisch aus sechs Steroiden verwendet. Die Messungen der Temperaturgradienten mit einer rein wässrigen mobilen Phase wurden auf zwei Zirchrom-PBD-Trennsäulen mit unterschiedlichen Innendurchmessern durchgeführt (Zirchrom-PBD, 150 x 3 mm, 5 µm; Zirchrom-PBD, 100 x 1 mm, 3 µm). Bei diesen Materialien handelt es sich um Zirkoniumdioxid, das mit Polybutadien beschichtet ist. Für die Basismessungen wurde ein Temperaturbereich von 60 bis 160 °C gewählt und Temperaturgradienten mit Steigungen von 1,5, 3,0, 4,0 und 6,0 °C/min angewendet. Im Anschluss daran wurden die Messungen der Temperaturgradienten mit einer Steigung von 1,5 und 4,0 °C/min genutzt, um das Chromatogramm bei Anwendung eines Temperaturgradienten mit einer Steigung von 3,0 °C/min zu simulieren. Abschließend erfolgte der Vergleich der simulierten mit den experimentell ermittelten Retentionsdaten, der für die unterschiedlichen Innendurchmesser der beiden PBD-Trennsäulen bestimmt wurde (s. Abb. 2). Es wird ersichtlich, dass die Differenzen der Retentionszeiten zwischen Drylab-Modell und Experiment mit einer maximalen Abweichung von 13 Sekunden für die 3 mm-ID-Säule und 23 Sekunden für die 1 mm-ID-Säule bei einer Gesamtlaufzeit von 25 Minuten sehr gering sind. Dies wird auch bei Betrachtung des relativen Fehlers deutlich. Dieser beträgt für die Simulation der Retentionszeiten bei Verwendung der 3 mm-ID-Säule 0,2 bis 1,3 Prozent bzw. 0,6 bis 1,5 Prozent bei Verwendung der 1 mm-ID-Säule. Diese Abweichungen sind so gering, dass bei der Simulation von Temperaturgradienten und Nutzung des SIM-HT-HPLC-200-Hochtemperaturofens keine temperaturabhängige Verzögerungszeit berücksichtigt werden muss.



3 Screenshot der Drylab-Software während der Methodenentwicklung für die rein wässrige Sulfonamid-Trennung.



4 Trennung von fünf Sulfonamiden und Uracil mittels Temperaturgradientenelution.

Trennung von Sulfonamiden

Die Leistungsfähigkeit des hier beschriebenen Simulationsmodells soll an einem weiteren Beispiel für eine rein wässrige Trennung von fünf Sulfonamiden gezeigt werden. Dazu wurden zunächst zwei Basismessungen in einem Temperaturbereich von 60 bis 180 °C mit Gradientensteigungen von 2 und 6 °C/min durchgeführt. Die Retentionsdaten wurden dann in die Drylab-Software eingegeben und eine Methodenentwicklung durchgeführt. Abbildung 3 zeigt einen Screenshot des „Gradient Editor" während der Methodenentwicklung für die Optimierung der Sulfonamid-Trennung. Im oberen Fenster dieses Editors ist der programmierte Temperaturgradient mit den entsprechenden Gradientenpunkten abgebildet. Diese können vom Anwender im Rahmen der Methodenentwicklung entsprechend der Vorgaben wie zum Beispiel der minimal geforderten kritischen Auflösung variiert werden. In dem darunter dargestellten Fenster ist das entsprechende Chromatogramm der Trennung abgebildet, sodass der Anwender direkt erkennen kann, welchen Einfluss Änderungen am Profil des Temperaturgradienten auf die Trennung der Analyten haben. In Abbildung 4 ist das Chromatogramm der optimierten rein wässrigen Sulfonamid-Trennung in einem Temperaturbereich von 60 bis 180 °C mit einer Laufzeit von ca. zwölf Minuten dargestellt (Stationäre Phase: Waters XBridge BEH C18, 75 x 4,6 mm, 2,5 µm;

Tabelle 1: Vergleich der simulierten und experimentell ermittelten Retentionszeiten für die optimierte Sulfonamid-Trennung

Analyt	Retentionszeit (Experiment) [min]	Retentionszeit (Simulation) [min]	Differenz [min]	Relativer Fehler [%]
Sulfadiazin	5,56	5,64	0,07	1,3
Sulfathiazol	6,13	6,22	0,09	1,5
Sulfamerazin	8,89	8,90	0,01	0,1
Sulfamethoxazol	10,41	10,26	-0,14	-1,4
Sulfamethazin	11,93	11,84	-0,09	-0,8

mobile Phase: 100 Prozent deion. Wasser mit 0,1 Prozent HCOOH; Flussrate: 1,0 mL/min, Injektionsvolumen: 1 µL; Detektion: UV bei 270 nm; Temperaturgradient: s. Abb. 4). Die einzelnen Substanzen sind basisliniengetrennt, die kritische Auflösung zwischen Sulfadiazin und Sulfathiazol beträgt 3,4. Um die Präzision der Simulation zu zeigen, ist in Tabelle 1 ein Vergleich der simulierten und experimentell ermittelten Retentionszeiten dargestellt. Dabei werden lediglich sehr geringe Abweichungen zwischen Simulation und Experiment mit einem maximalen relativen Fehler von 1,5 Prozent festgestellt. Neben der präzisen Vorhersage der Retentionszeit muss auch die durch den Anwender vorgegebene Auflösung genau simuliert werden können. Auch dies ist bei Verwendung des zuvor beschriebenen Modells gegeben. Die Auflösung des kritischen Peakpaars in Abbildung 4 (Sulfadiazin und Sulfathiazol) wird mit einem relativen Fehler von 3,2 Prozent sehr präzise vorhergesagt.

Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass eine präzise Vorhersage von Retentionszeiten und kritischer Auflösung bei Anwendung der Temperaturgradientenelution in der Flüssigchromatographie möglich ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Drylab-Software in der Version Drylab2010-HT um dieses Modell zur Simulation von Temperaturgradienten erweitert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bei Verwendung des SIM-HT-HPLC-200-Säulenofens für die Modellrechnung von Temperaturgradienten keine temperaturabhängige Verzögerungszeit berücksichtigt werden muss. Somit ist dieses Heizsystem ideal für Temperaturgradientenelutionen in der Flüssigkeitschromatographie geeignet.

Dieses Forschungsvorhaben wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi), aus dessen Haushaltsmitteln über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke" e. V. (AiF) unter der Nummer KF 0087408 DA7 gefördert.

laborpraxis.de
• Die Literatur zum Artikel finden Sie hier
Zusätzliche Informationen unter www.laborpraxis.de
InfoClick 325869