

Expertentipp: Säulenregeneration

Ablagerungen auf der stationären Phase sind ein häufiger Grund für eine Beeinträchtigung der Säulenperformance. Dies äußert sich vor allem durch

- einen erhöhten Rückdruck,
- verschobene Retentionszeiten oder
- deformierte Peaks.

Um Ablagerungen zu verhindern, werden der Einsatz von Vorsäulen und eine entsprechende Probenvorbereitung wie beispielsweise Filtration empfohlen.

Sowohl zur Vorbeugung als auch dann, wenn es bereits zu einer Adsorption von Material auf der stationären Phase gekommen ist, sind Spülschritte eine effektive Maßnahme zur Regeneration der Säule. Das Spülen sollte immer gegen die Flussrichtung durchgeführt werden, da sich die Verunreinigung meist noch am

Säuleneingang befindet und so leichter herausgespült werden kann. Als ausreichende Spülmenge sind mindestens 20 Säulenvolumen mit einem geeigneten Lösungsmittel empfehlenswert. Bei der Auswahl der Lösungsmittel sollten die Eigenschaften der Verunreinigung sowie die Beständigkeit der Säule beachtet werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über geeignete Lösungsmittel in Abhängigkeit von verschiedenartigen Verunreinigungen.

Die Effizienz der Reinigung kann durch erhöhte Temperatur gesteigert werden. Je nach eingesetztem Lösungsmittel und unter Berücksichtigung der Beständigkeit der stationären Phase sind 40 °C – 90 °C hierfür einsetzbar. Weitere Empfehlungen können auch den Anweisungen der Säulenherstellereutnommen werden, zum Beispiel den „Care and Use Instructions“

Tabelle 1: Geeignete Lösungsmittel zur Säulenregeneration.

Verunreinigung durch			
Salze	unpolare Substanzen	polare Substanzen	Proteine
<ul style="list-style-type: none"> • Wasser und wässrige organische Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Acetonitril • Isopropanol • Tetrahydrofuran • Dichlormethan • Chloroform 	<ul style="list-style-type: none"> • Wasser und wässrige organische Lösungen • Methanol • Tetrahydrofuran 	<ul style="list-style-type: none"> • Injektion von Dimethylsulfoxid • Gradient von 10 % auf 90 % B mit A = 0,1 % TFA in Wasser und B = 0,1 % TFA in Acetonitril

Im Folgenden werden drei Beispiele aus der Praxis gezeigt, bei denen erfolgreich Regenerationsschritte angewendet wurden.

A) Reduzierung des Rückdrucks

Bei der Qualitätskontrolle eines Wirkstoffs wurde nach mehreren Injektionen ein Druckanstieg um 180 bar festgestellt. Um die Säule zu regenerieren, wurde sie zunächst mit Acetonitril/Wasser(60/40) und anschließend mit Isopropanol (jeweils 20 Säulenvolumen) gegen die Flussrichtung gespült. Der Druck entsprach anschließend wieder seinen initialen Werten des Column Inspection Reports (CIR), so dass die Säule weiter verwendet werden konnte (siehe Tabelle 2).

lenvolumen) gegen die Flussrichtung gespült. Der Druck entsprach anschließend wieder seinen initialen Werten des Column Inspection Reports (CIR), so dass die Säule weiter verwendet werden konnte (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Reduzierung des Rückdrucks.

Schritt	Druck [bar]
CIR	55
vor Regeneration	227
nach Spülen mit ACN/H ₂ O (60/40)	85
nach Spülen mit 100% IPA	58

B) Reduzierung von Peakverbreiterung und Tailing

Nach 75 Injektionen wurde bei der Analytik eines Lokalanästhetikums eine verschlechterte Säulenperformance beobachtet, welche sich in verbreiterten Peaks und erhöhtem Tailing geäußert hat.

Zunächst wurde die Säule unter den Bedingungen des Column Inspection Report (CIR) erneut getestet (Eingangstest). Anschließend wurde die Säule verschiedenen Regenerationsprozeduren unterzogen. Dazu wurde die Säule mit jeweils 20 Säulenvolumen wie folgt gegen die Flussrichtung gespült:

1. Acetonitril
2. Isopropanol
3. Isopropanol / Tetrahydrofuran (90/10)

Nach den Regenerationsschritten wurde jeweils ein Säulentest durchgeführt.

Durch die jeweiligen Spülschritte haben sich die Peakbreite und das Tailing verringert (siehe Tabelle 3). Die Peakform wurde vor allem durch den 3. Regenerationsschritt verbessert, bei dem Tetrahydrofuran eingesetzt wurde (siehe Abbildung 1). Dies deutet auf eine Ablagerung von beispielsweise hydrophoben Substanzen auf der stationären Phase hin.

Tabelle 3: Reduzierung von Peakverbreiterung und Tailing.

Schritt	Substanzen	Retentionszeit [min]	Tailing Faktor
CIR	Uracil	1,44	
	Methylbenzoat	4,12	1,08
	Naphthalin	8,30	1,02
Eingangstest	Uracil	1,45	
	Methylbenzoat	4,08	1,40
	Naphthalin	8,08	1,40
nach Schritt 1	Uracil	1,48	
	Methylbenzoat	4,10	1,20
	Naphthalin	8,14	1,20
nach Schritt 2	Uracil	1,48	
	Methylbenzoat	4,12	1,13
	Naphthalin	8,16	1,13
nach Schritt 3	Uracil	1,48	
	Methylbenzoat	4,14	0,98
	Naphthalin	8,13	1,05

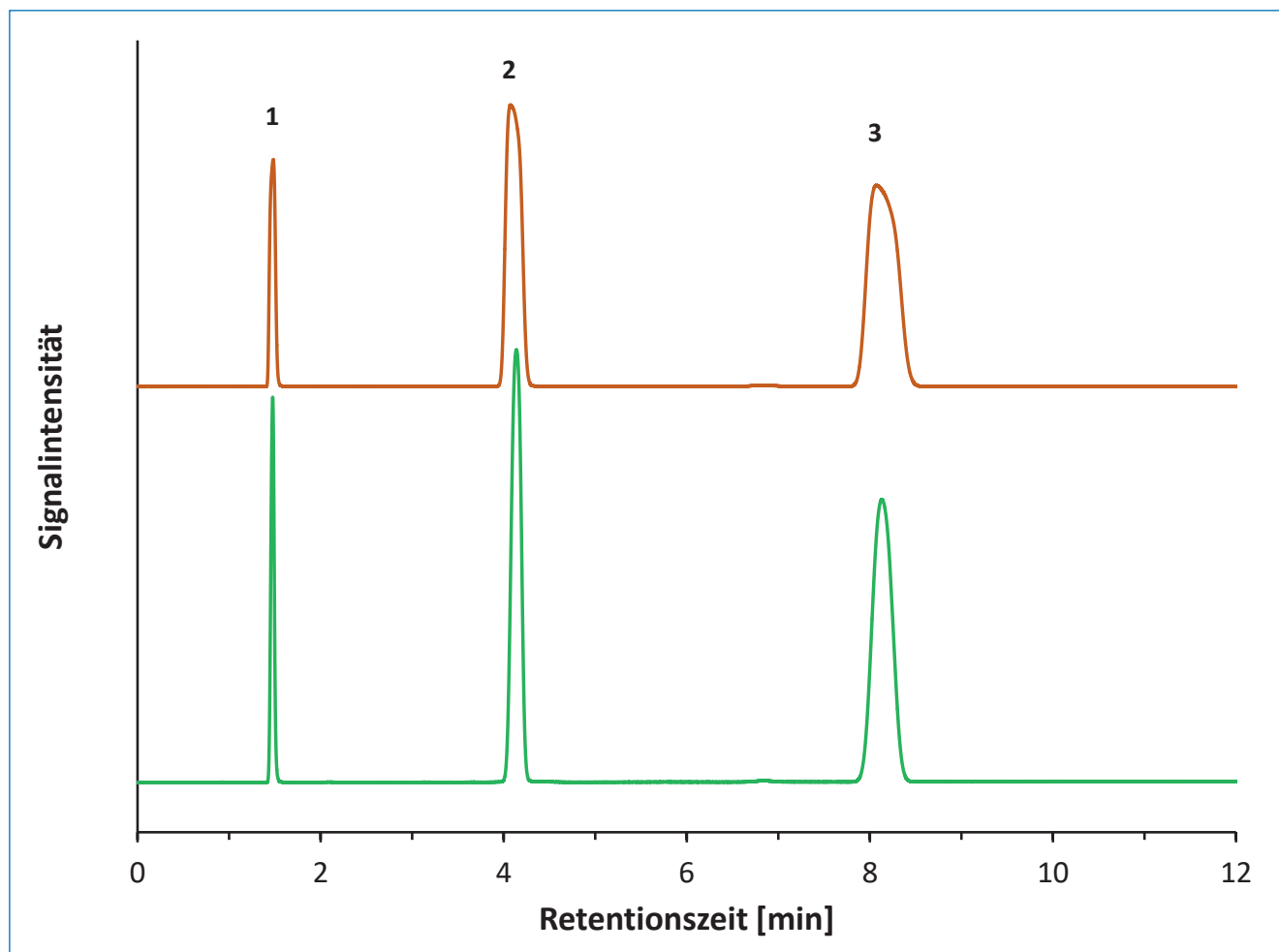


Abbildung 1: Chromatogramm Eingangstest (oben) und nach Schritt 3 (unten); 1=Uracil, 2=Methylbenzoat, 3=Naphthalin.

C) Eliminierung von Peaksplitting und Retentionszeitverschiebung

Bei der Analytik eines nichtsteroidalen Antirheumatikums wurden im Verlauf von mehreren Wochen ein Peaksplitting und eine Verschiebung der Retentionszeiten festgestellt.

Zunächst wurde die Säule unter den Bedingungen des Column Inspection Report (CIR) erneut getestet (vor

Regeneration, siehe Abbildung 2 oben). Anschließend konnten durch das Spülen mit 20 Säulenvolumen Acetonitril gegen die Flussrichtung die Peakform wieder verbessert und die Verschiebung der Retentionszeit eliminiert werden (nach Regeneration, siehe Abbildung 2 unten).

Tabelle 4: Eliminierung von Peaksplitting und Retentionszeitverschiebung.

Schritt	Substanzen	Retentionszeit [min]	Tailing Faktor
CIR	Uracil	1,27	
	Methylbenzoat	4,38	1,10
	Naphthalin	9,06	1,05
vor Regeneration	Uracil	1,33	
	Methylbenzoat	8,38	1,49
	Naphthalin	11,34	1,60
nach Regeneration	Uracil	1,28	
	Methylbenzoat	4,41	0,97
	Naphthalin	9,11	0,97

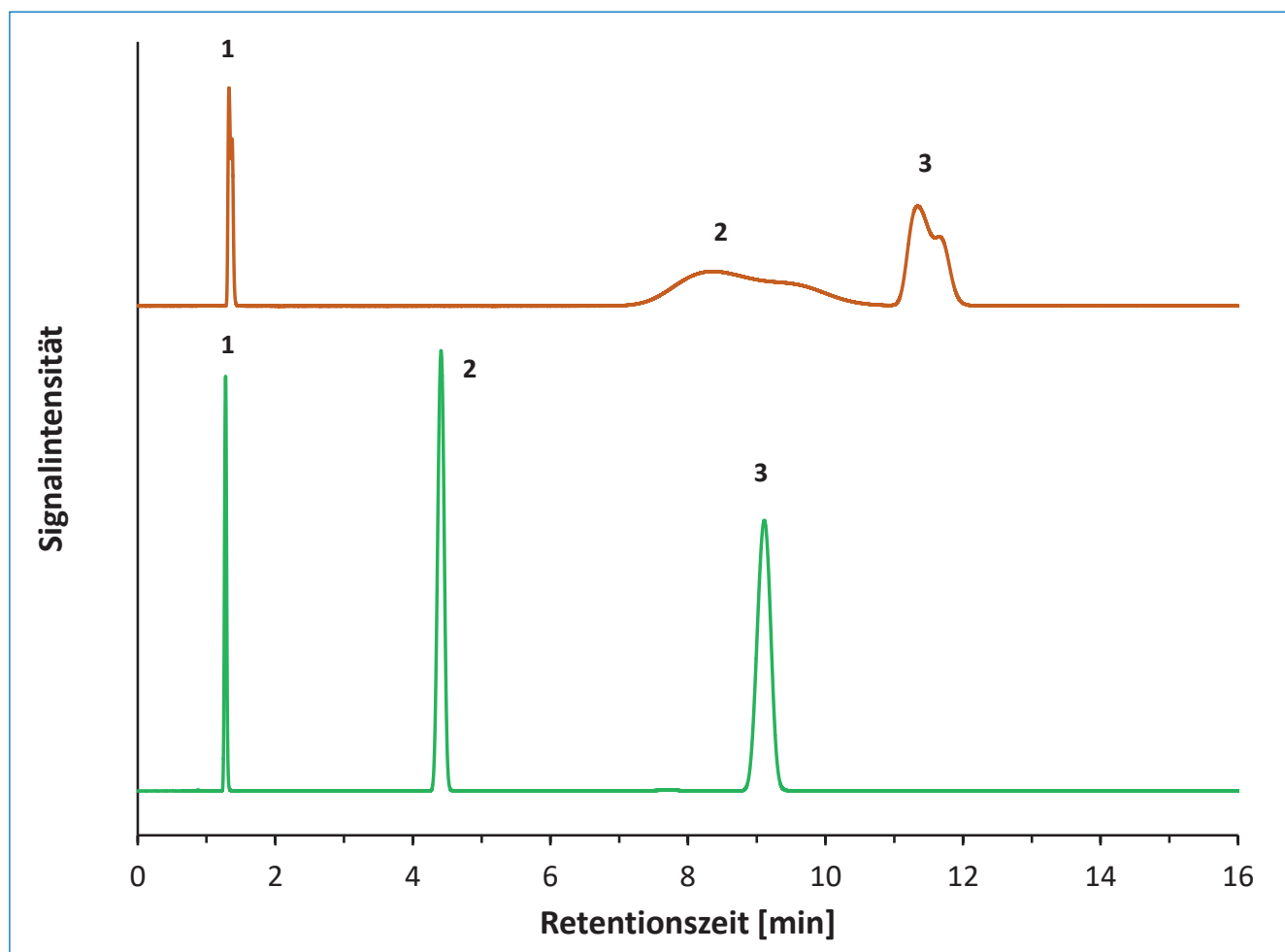


Abbildung 2: Chromatogramm vor Regeneration (oben) und nach Regeneration (unten); 1=Uracil, 2=Methylbenzoat, 3=Naphthalin.