

# Steigerung der Effizienz des Labors

## Fallbeispiel: Beschleunigte Reinheitsüberprüfung in der Prozesschromatographie

Eine Lösung, die von Herstellern von Chromatographiesystemen schon seit einigen Jahren forciert wird, ist die Anschaffung neuer UHPLC-Systeme. Der Vorteil dieser Systeme beruht auf der Optimierung der Systeme bezüglich des Totvolumens sowie der Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Detektoren. Zusätzlich erlauben diese Systeme die Verwendung von sub-2  $\mu\text{m}$  Partikeln, da Sie deutlich höheren Drücken widerstehen als traditionelle HPLC Systeme.

### Core-Shell Technologie

Konsequente Weiterentwicklung der Herstellungstechniken für Kieselgel basierte Partikel hat jetzt einen zusätzlichen Weg für Laboratorien aufgezeigt, ohne große Investitionen in Systeme die Effizienz signifikant zu steigern.

Die innovativen Kinetex Core-Shell Materialien von Phenomenex greifen eines der etablierten Modelle für das Erzielen hoher chromatographischer Trennleistungen auf. Bei Core-Shell Materialien wird das Trägermaterial auf reduzierte Diffusionskoeffizienten hin optimiert. Dies führt dazu, dass sich diese Materialien von Ihren chromatographischen Eigenschaften her deutlich näher am theoretischen Ideal befinden als vollporöse sub-2  $\mu\text{m}$  Kieselgel Materialien. Diese Tatsache führt dazu, dass Partikel mit einem Durchmesser von 2,6  $\mu\text{m}$  vergleichbare Trennleistung wie vollporöse sub-2  $\mu\text{m}$  Partikel liefern. Allerdings geschieht dies bei einem deutlich niedrigeren Rückdruck, da dieser umgekehrt proportional zur Partikelgröße des Packungsmaterials ist. Dies ermöglicht es, dass diese Säulen auch auf klassischen HPLC-Systemen mit einem maximal zulässigen Rückdruck von 400 bar eingesetzt werden können [1].

Um die Anwender von klassischen HPLC Systemen bei der Verwendung der Core-Shell Säulen zu unterstützen, hat Phenomenex Hilfsmittel entwickelt. Zu diesen Hilfsmitteln gehören unter anderem Applikationsmitteilungen aus spezifischen Anwendungsbereichen.

### Einfluss und Optimierung des HPLC-Systems

Bevor nun an einem Beispiel die Möglichkeiten, die diese Säulen den Anwendern bieten, aufgezeigt werden, wird zuerst noch auf ein paar Dinge eingegangen, die einem erfolgreichen Einsatz im Labor im Wege stehen können.

UHPLC Trennungen zeichnen sich dadurch aus, dass die Laufzeiten kurz und die erhaltenen Peaks schmal sind. Wenn man ein HPLC System

**In den letzten Jahren stehen immer mehr Laboratorien unter Druck mehr Proben mit weniger Personal durchzuführen. Grund für diese Entwicklung ist zum einen der Konkurrenzdruck in vielen Bereichen aufgrund der geringen Kosten in Ländern wie China und Indien. Gerade die pharmazeutische Industrie hat viele Standorte in Hochlohnländern zugunsten von Standorten in Indien und China geschlossen. Auch die Konkurrenzsituation im Bereich der unabhängigen Untersuchungslaboratorien sowie der Lohnhersteller von Wirkstoffen ist durch Fusionen verschärft worden. Unternehmen die zum einen Ihre Standorte in Ländern wie Deutschland, Österreich und der Schweiz sichern wollen, beziehungsweise gar nicht die Möglichkeit haben, neue Standorte in Indien und China aufzubauen, können dieser Situation nur durch Effizienzsteigerung begegnen.**

einsetzt, dass bisher nur mit Säulen, die mit 3  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  oder sogar 10  $\mu\text{m}$  Materialien gepackt waren, betrieben wurde, sind die Systemeinstellungen in der Regel für diesen Einsatz optimiert.

Den größten Einfluss auf das Ergebnis hat der Detektor. Zum einen kann ein großes Detektorzellvolumen dazu führen, dass die Peaks verbreitert werden. Für UHPLC Trennungen sind Detektorzellvolumina von 1,5  $\mu\text{l}$  und kleiner von Vorteil. Die Standard Detektorzellen in vielen HPLC-Systemen haben häufig noch deutlich größere Volumina. Zum anderen kann der Detektor einfach zu langsam sein, um die schmalen Peaks zu erfassen. Ein Peak kann gut erfasst werden, wenn mindestens 20 Messpunkte zur Verfügung stehen. Die Detektoren erlauben es, über Einstellung der Scanrate oder Zeitkonstante (Time Constant) möglichst viele Messpunkte pro Zeiteinheit zu erhalten. Hat man zu wenige Messpunkte werden die Peaks breiter und flacher, außerdem lässt die Reproduzierbarkeit von Messung zu Messung nach.

Da bei UHPLC Trennungen die Peakbreiten im niedrigen Sekundenbereich liegen, sind Scan-

raten von 10 Scans/s und besser nötig, um maximale Ergebnisse zu erzielen.

Zusätzlich zur Detektorzelle tragen die Kapillaren und das Injektionssystem zum Totvolumen des Systems und somit breiteren Peaks bei. Standardmäßig sind in vielen HPLC-Systemen Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,254 mm (0,010 Zoll) installiert. Diese haben ein internes Volumen von 0,51  $\mu\text{l}$  je Zentimeter Länge. Bei der Verwendung von Kapillaren mit 0,127 mm (0,005 Zoll) Innendurchmesser reduziert sich dieses Volumen um ca. 75 % auf 0,13  $\mu\text{l}$  je Zentimeter.

Außerdem sollte auch das Injektionssystem auf möglichst geringes Totvolumen hin optimiert werden. Denn dieses Volumen führt dazu, dass die Aufgabezone auf der Säule breiter wird je größer das Volumen ist. Je breiter die Aufgabezone ist, umso breiter sind die erhaltenen Peaks.

### Fallbeispiel

Im Folgenden wird aufgezeigt wie der Einsatz einer Kinetex Core-Shell Säule die Reinheitsüberprüfung in der Prozesschromatographie beschleunigt. Hierbei werden die Fraktionen, die bei der präparativen Umkehrphasen-Aufreinigung von rohem Bivalirudin, einem direkten Thrombin Inhibitor, auf einer Luna 10  $\mu\text{m}$  PREP C8(2) angefallen sind, auf ihre Reinheit untersucht.

### Experimenteller Teil

Alle chromatographischen Trennungen erfolgten auf einem Agilent HP 1100 System mit automatischem Probengeber und UV-Detektor. Die verwendeten Laufmittel waren 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (Laufmittel A) und 0,1 %

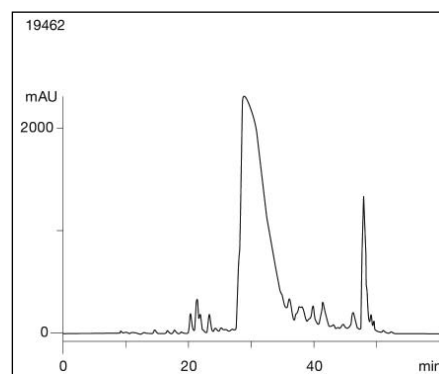


Abb. 1: Präparative Aufreinigung von Bivalirudin

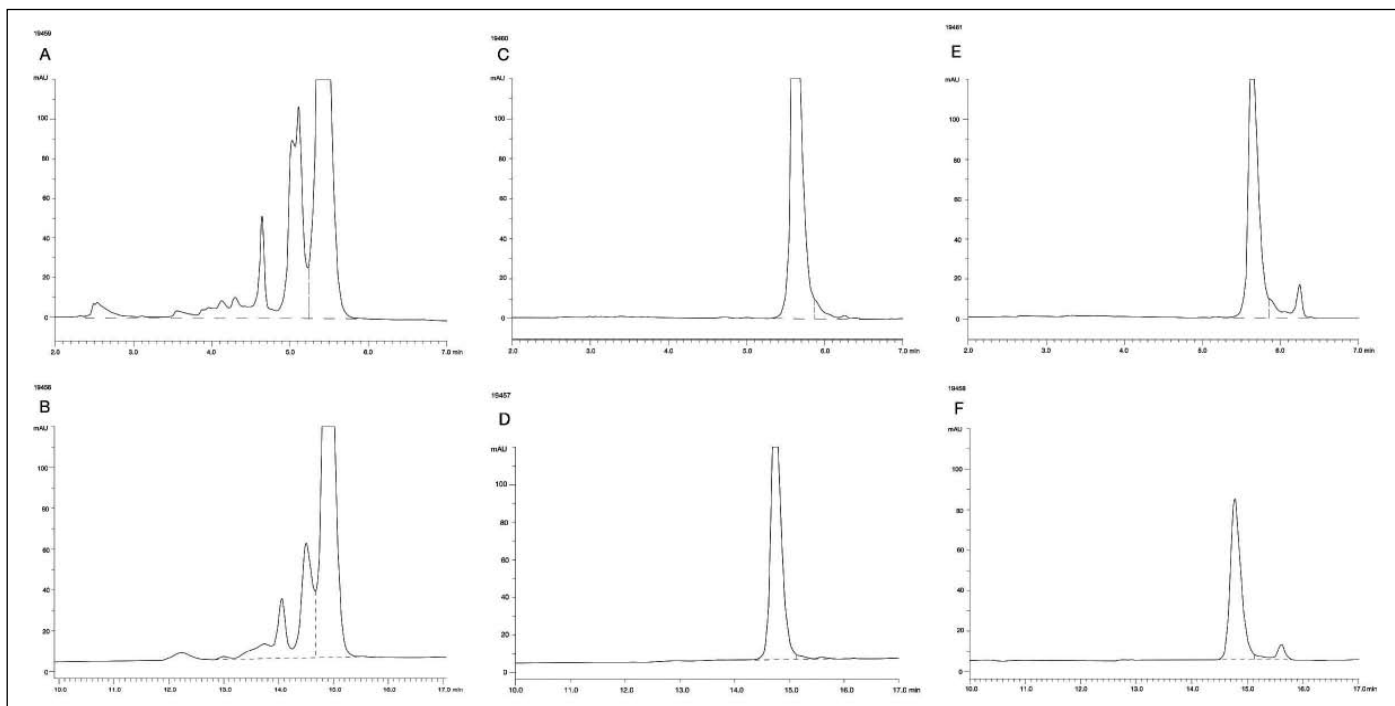


Abb. 2: Gegenüberstellung der erhaltenen Chromatogramme für die Fraktionen (28,8 min, 32,2 min und 33,2 min). Die Chromatogramme A, C und E wurden mit der Kinetex Säule erhalten. Chromatogramme B, D und F zeigen die Chromatogramme, die mit der klassischen Säule erhalten wurden.

TFA in Acetonitril (Laufmittel B). Die präparative Trennung wurde auf einer Luna 10 µm PREP C8(2) 250 x 4,6 mm durchgeführt. Hierbei wurden 5 ml einer Lösung von rohem Bivalirudin mit der Konzentration 7 mg/ml auf gegeben. Die Trennung erfolgte mittels eines 40-minütigen Gradienten von 15 % B auf 35 % B. Anschließend wurde die Säule mit 80 % B gespült und wieder auf die Ausgangsbedingungen äquilibriert was zu einer Zykluszeit von 55 Minuten führte. (Abb. 1) Die Elution der Analyten wurde mit einem UV-Detektor bei 220 nm erfasst. Es wurden Fraktionen mit einer Dauer von 0,2 Minuten gesammelt.

Die Reinheitsüberprüfung der Fraktionen erfolgte zum einen auf einer Säule in den Dimensionen 250 x 4,6 mm gepackt mit einem 5 µm vollporösen C8-Material. Zum anderen wurde eine Kinetex 2,6 µm C18 100 x 4,6 mm Säule verwendet. Für die C8 Säule wurde ein 30-minütiger Gradient von 20 % B auf 50 % B gefahren. Die Zykluszeit betrug 45 Minuten. Für die Kinetex Säule (C18) wurde ein 8-minütiger Gradient von 23 % B auf 31 % B gefahren. Hier betrug die Zykluszeit 11 Minuten.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Analysenergebnisse der Trennungen der C18 Säule und der C8 Säule, die mit einem klassischen vollporösen Material gepackt war, wurden verglichen. Dazu wurden die Ergebnisse unterschiedlicher Fraktionen aus dem gesamten Elutionsprofil der präparativen Trennung einander gegenübergestellt (Abb. 2).

Die C18 Säule zeigte durch ihre hohe Trenneffizienz eine sehr gute Abtrennung der Verunreinigungen vom Wirkstoffmolekül sowie deutlich höhere und schärfere Peaks. Dies ermöglichte

eine genauere und empfindlichere Bestimmung des Wirkstoffgehalts in den einzelnen Fraktionen. Im Endergebnis ergaben die Analysen für

Tabelle 1: Vergleich der geschätzten Reinheit der Fraktion anhand von HPLC Messungen mit einer Core-Shell Säule (C18) und einer mit vollporösen 5 µm Partikeln gepackten Säule (C8).

Fraktion	Reinheit [%]	Kinetex
Retentionszeit [min]	Vollporöse 5 µm C8	Core-Shell C18
28,8	73	65
29,0	91	87
29,2	95	93
29,4	96	96
29,6	98	96
29,8	98	95
30,0	99	97
30,2	98	96
30,4	97	96
30,6	96	96
30,8	96	94
31,0	95	93
31,2	94	96
31,4	98	96
31,6	97	94
31,8	98	95
32,0	98	95
32,2	98	95
32,4	98	95
32,6	97	90
32,8	95	83
33,0	94	83
33,2	91	87
33,4	89	81
33,6	86	72
33,8	84	72
34	80	71

alle Fraktionen eine exaktere Angabe des Reinheitsgrades und half dabei die Fraktionen mit ausreichender Reinheit besser einzugrenzen (Tabelle 1).

## Zusammenfassung

Die Analyse der Fraktionen präparativer Trennungen ist Standard für die Bestimmung der Reinheit von Peptiden. Kinetex Säulen (C18) liefern wegen ihrer Trenneffizienz deutlich exaktere Ergebnisse und das auch in einer deutlich kürzeren Zeit. Die 27 Hauptfraktionen konnten innerhalb von 5 Stunden analysiert werden, während für die klassische Analytik 14,5 Stunden benötigt wurden. Zusätzlich waren die Ergebnisse genauer, was eine Entscheidung darüber erleichtert, welche Fraktionen zusammengefasst werden können um die gewünschte Reinheit zu erhalten. Bei Umstellung der Analytik können mit einem analytischen HPLC System dreimal so viele Fraktionen analysiert werden und somit der Ausstoß an Peptiden mit der gewünschten Reinheit deutlich erhöht werden.

## Literatur

- [1] Grittia F. et al.: G. Journal of Chromatography A, 1217(10), 1589–1603 (2010)

## ► KONTAKT

Dr. rer. nat. Dirk Hansen  
Marketing Manager Europe  
Phenomenex, Aschaffenburg  
Tel.: 06021/58830-0  
Fax: 06021/58830-11  
www.phenomenex.com