

Drei kritische Gedanken zur Chromatographie von morgen und ein Abschiedswort

Gute Instrumentenausstellungen auf Internationalen Fachtagungen sind wertvoll. Sie können frühzeitig auf mögliche neue Arbeitsrichtungen hinweisen und zwar ebenso nachhaltig wie eine kritisch geführte Diskussion oder ein fulminanter Vortrag auf der Tagung selbst.

Mir erschienen drei Neuigkeiten – je eine auf je einer Ausstellung des Jahres 1977 – als interessant.

Meine Auswahl ist selbstverständlich subjektiv, bei allem guten Willen, und das wird ebenso selbstverständlich Kritik auslösen. Ich finde das aber gut so. Ich werde auf den jeweiligen „Haken“ extra hinweisen!

1. Dadai Ishii's Micro Scale HPLC, Frühjahr 77, Pittsburgh Conference, Cleveland, U.S.A.

D. Ishii-Nagoya (Japan) füllt 0,5 mm weite, 1,2 mm wandstarke und 100 bis 300 mm lange Teflonrohre mit 5 μ - bis 10 μ -HPLC Materialien (Adsorptions-, reversed phase-, Ionenaustausch- etc). Er verschließt Ein- und Ausgang mit 5 μ feiner Quarzwatte, woraus Pfropfen von 1 mm Dicke im Teflonrohr gepreßt werden. Das Füllen ist problemlos: Man saugt einen „slurry“ mit einer gasdichten Spritze durch einen Quarzwattepfpfen. Dabei ist nicht einmal Ultraschall nötig, denn durch anschließendes kräftiges Hindurchdrücken von mobiler Phase wird die Packung homogenisiert. Das liegt an den Wandeigenschaften des Teflons. Hier entschärft sich auch das Problem „Wandgängigkeit“.

Gäbe es bereits passend dimensionierte Stahlröhrchen, dann könnte man die z.B. 6–8000 realen Trennstufen einer 200–300 mm langen Ishiisäule tatsächlich auch auf den Schreiber bringen. Sicher, die Analysengeschwindigkeit ist sehr langsam. „b₀“ ist derzeit noch katastrophal. Aber schon die Anschlußtechnik begeistert: Mit einem scharfen Messer Länge passend schneiden. Enden aufweiten. Auf Detektoreingang aufstecken. Mit 1 Mikroliterspritze Probenlösung dosieren. Spritze aus Säuleneingang herausziehen. Leitung zur „Pumpe“ aufstecken. Anschalten. Die „Pumpe“ ist eine dickwandige 250 Mikroliter-Glasspritze. Ändern der Phasenwahl ist eine Sekundenfrage. Der Phasenverbrauch ist ruinös für Chemikalienlieferanten: Er liegt bei 2–20 Mikroliter pro Minute.

Das gleiche gilt für den Verbrauch an stationärer Phase: 60 Milligramm pro Säule. Der Detektor setzt neue Maßstäbe: 0,1 Mikroliter Zellenvolumen und als Spektralphotometer mit vergleichbarer Empfindlichkeit wie jeder gute UV-Detektor. Druckfeste Zelle, allerdings extrem flußempfindlich. Mikrobauteile, welche sachgerechten hinflush, backflush und columnswitching erlauben, sind

in Kürze verfügbar. Solche Methoden in der HPLC können sowieso nicht mehr „verhindert“ werden, seitdem man die instrumentell-technische Verminderung der von dem Trennsystem aus lieferbaren Trennleistung quantitativ exakt erfassen kann. Wir hatten sogar mit 30 mm langen Ishiisäulen Erfolg!

Die ganze Sache hat nur einen Haken:

Wir alle haben gelernt, daß man HPLC-Säulen unter 2 mm lichter Weite nicht qualifiziert packen könne, „the devil knows why“. Und somit gibt es das gar nicht, was man in Cleveland, Ohio, im Frühjahr 1977 gesehen hat.

2. CAMAG's simultaner-4-Phasen-Circular-Chromatograph (HPTLC), Twelfth International (Zlatkis-) Symposium on Advances in Chromatography, Amsterdam, November 1977

Zwei, drei oder vier unterschiedliche (genügend mischbare, im TLC-physikalischen Verhalten genügend ähnliche) mobile Phasen werden auf eine „high resolution Dünnschicht-Platte“ gepumpt, auf der die Probe in einem Ring scharf fokussiert um die Einspeisestellen herum gelegt wurde. An den Berührungsgrenzlinien der zwei bis vier Phasen bilden sich selbsttätig alle Mischungsverhältnisse der Grundphasen aus, sie bleiben lokal konstant, sofern genügend viel Phase bis zur Einstellung stabiler Zustände eingeströmt ist. Es „geht“ natürlich nicht immer „alles“, insbesondere, wenn statt chemisch gebundener reversed phase reines Adsorptions-TLC-Plattenmaterial verwendet wird. Auch diese Methode hat harte Grenzen. Aber aus der Lage der Berührungslinien bzw. aus deren Winkel folgt recht einfach eine Möglichkeit zur Abschätzung der dort herrschenden Phasenzusammensetzung. Der Schätzwert wird nun experimentell eingestellt, und schon nach drei Versuchsläufen hat man die wahre optimale Zusammensetzung eng eingekreist.

Ein Beispiel:

Phase 1 sei Wasser : Methanol 90 : 10 vol/vol

Phase 2 sei Wasser: Tetrahydrofuran 95 : 5 vol/vol

Exakt auf der Berührungslinie zwischen beiden Phasen bildet sich das Gemisch Wasser : Methanol : Tetrahydrofuran 92,5 : 5 : 2,5 vol/vol/vol (von Mischvolumendefekten abgesehen). Neben dieser „Mittenlinie“ liegen die rasch zur Grundzusammensetzung der Einzelphase tendierenden Übergangsmischungen. *Dort* ist die Phasenzusammensetzung ideal, wo die günstigste Lage der getrennten Substanzlinien und deren größte Einzelzahl liegt. Seit 12 Monaten zeigt das Chromatographia-Titelblatt ein praktisches Beispiel aus der Adsorptions-HPTLC, dreiphasig simultan circular getrennt.

Man kann vier der fünf schrittmotorgetriebenen Phasenpumpen als flußkonstante Dosierpumpen „mißbrauchen“ und vier Proben zugleich auf der HPTLC-Platte hochanreichern. Wir haben es mit 250 Mikroliter versucht. Ausgehend von der stoffabhängigen, aber mitunter enormen Nachweisempfindlichkeit auf der Platte, im Falle Aflatoxinen z.B. bei 25 Picogramm liegend, errechnet sich bei 250 Mikroliter Dosiervolumen eine Nachweisgrenze von 10^{-8} %, oder 100 ppt, um dieses unglückliche und mißverständliche Konzentrationsmaß einmal zu gebrauchen. Da die hochangereicherte Probe auf der Platte von Störstoffen vor-abgetrennt werden und anschließend scharf fokussiert werden kann, und da in der TLC Stoffe mit großem k (kleiner Rf-Wert) besonders empfindlich nachgewiesen werden können, zeigt sich an diesem Beispiel, wie unglücklich (und theoretisch wie praktisch falsch) eine Diskussion ist, die HPLC gegen HPTLC stellt und mit dem schlimmen Fehlurteil endet, TLC sei „obsolet“.

Die ganze Sache hat jedoch einen Haken:

Der Berichterstatter kann unmöglich von dem Verdacht freigesprochen werden, subjektiv vorbelastet zu sein, u.a. mit dem sogenannten „IH-Faktor“. Man weiß inzwischen, daß das Gegenteil des IH-Faktors, der „NIH-Faktor“, den instrumentell-technischen, ja leider auch den methodischen Fortschritt in der experimentellen Chromatographie nachhaltig behindern kann. (Für unsere medizinischen Leser: NIH heißt: not invented here!)

3. Leistungsfähige Kleinrechner (anstatt oder zusätzlich zu unterdimensionierten Mikroprozessoren) informativ mit dem Chromatographen zusammengeschaltet, Interkama, Düsseldorf, Oktober 1977

Ganze Serien neuer Chromatographen sind jetzt endlich mit Mikroprozessoren ausgerüstet. Ein verzweifelt wirkender Fachkollege von seiten eines Instrumentenherstellers fragte, was man denn mit den Mikroprozessoren machen sollte? Ich habe Bedenken, ihn tröstend beraten zu können. Nach meiner ganz subjektiven Meinung sind seine Mikroprozessoren nämlich hoffnungslos unterdimensioniert. Hätte sein Instrument das, was Philips (siehe oben) zeigte, dann wäre möglich und enorm praktisch nützlich:

- zum Beispiel drei Peakdaten aus einem Testgemisch zur automatischen Flußoptimierung heranzuziehen und diese zu halten;
- vier Peakdaten aus dem Probengemisch zur automatischen Polaritätsoptimierung heranzuziehen (nach D.R. Deans, H. Purnell und V. Pretorius), indem man zwei Säulen hintereinanderschaltet und mit unterschiedlichen Drucklevels und *in einem* Thermostaten (trotzdem) mit unterschiedlichen Temperaturen betreibt. Wir haben dazu die elektronischen Schaltbauteile und die instrumentelle Technik. Der Rechner könnte aus
- vier Wiederholmessungen bei jeweils unterschiedlicher Dosiermenge die Signallinearität feststellen und als Grenzkontrollwert dem Integrator mitteilen, damit dort nicht mehr so viel „gelogen“ wird;

- er könnte in der isokratischen GC den entscheidend wichtigen Totzeitwert aus *mehr* als drei Retentionsindex-Bruttoretentionszeit-Wertepaaren *optimal* berechnen, welcher die Retentionsindices der getrennten Stoffe um nahezu eine ganze Größenordnung *richtiger* zu berechnen gestattet als dies bislang möglich war (die *hierdurch* erreichbare Präzision ist so unglaublich, daß ich mich nicht getraue, darüber unaufgefordert zu publizieren);
- und nicht zuletzt könnte ein leistungsfähiger Kleinrechner on-line Chromatographie dann, wenn man sich schneller Trennsysteme bedient, welche es *allein* erlauben, vier Wiederholanalysen zu machen, folgendes: aus vier Wiederholwerten nach den unausweichlichen Gesetzen statistisch-mathematischer Datenbehandlung jene Endresultate zu berechnen, die *allein* Basis ernstzunehmender Entscheidungen sind. Eines Tages wird man ja doch Rechenmethoden anwenden, welche zeigen, daß fehlerhafte oder unsichere Analysenergebnisse viel teurer sind als eine noch so teure instrumentelle Chromatographie. (Die automatische Detektoroptimierung geht übrigens auch so!)

Die Sache hat allerdings einen Haken:

Wenn man falsch Probe nimmt oder Dosiermethoden falsch beurteilt (bitte nicht Wiederholbarkeit mit Vergleichbarkeit und diese mit Diskrimination verwechseln!), oder wenn man das gleiche Problem durch Titration hätte richtiger lösen können, dann helfen auch ausreichend dimensionierte Mikroprozessoren on-line in closed loop zum Chromatographen geschaltet *nicht*!

Ich hätte Ihnen gern über theoretische Grundlagen zu den „drei Gedanken“ und über die Anwendung der Ganzheitsmethode in der Chromatographie berichtet, die selbstverständlich auch in der HPLC dem Praktiker wirklich hilft, genauso, wie sie theoretisch sauber abgesichert ist, aber wir Chromatographia-Editoren waren uns darüber nicht so recht einig.

Der bisherige managing editor verabschiedet sich von Ihnen als Chromatographia-Leser.

Ich wünsche Ihnen Erfolg in Ihrer sicher schwierigen, aber sicher auch so schönen Arbeit im Bereich der wichtigsten analytischen Methode von heute!

Auch in Zukunft werde ich mich bemühen, an der Vertiefung theoretischer Gemeinsamkeiten aller chromatographischer Methoden und an deren voller Nutzung in der Praxis mitzuarbeiten.



R. E. Kaiser

Dezember 1977