

Der HPLC-Tipp im April

## Warum macht nur *ein* Peak Probleme? (II)

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

### Der Fall

Im letzten Monat haben wir uns darüber unterhalten, dass bestimmte Komponenten durch Adhäsion an diversen Oberflächen gänzlich oder teilweise irreversibel haften bleiben können. Deswegen sollte man im Falle des Falles auch an unwichtig anmutende Änderungen oder Unterschiede in den Abläufen und in den Utensilien von Labor zu Labor denken. Heute wollen wir schauen, welche, eher chemische Ursachen infrage kommen, wenn eben nur ein Peak im Chromatogramm (oder auch zwei) Probleme bereitet(en).

### Die Lösung

Vorweg: Vermutlich ist der pH-Wert oder - genauer - seine Veränderung die wichtigste Ursache für das hier besprochene Problem und hier wiederum dürften folgende zwei Effekte die häufigsten sein: Geänderter pH-Wert der Probenlösung oder eine ungewollte Änderung des pH-Wertes während der Trennung selbst. Es folgen nun stichwortartig Beispiele für eine ungewollte Veränderung des pH-Wertes, das sind Veränderungen ohne bewusstes Tun seitens des Anwenders. Oder aber der Anwender verändert doch „etwas“ und denkt nicht daran, dass dabei nur eine Komponente auf diese Änderung reagiert.

- Nach der Zugabe von MeOH oder ACN ändert sich der pH-Wert, das kann je nachdem bis zu zwei pH-Einheiten ausmachen. Ein Beispiel dazu: Der  $pK_s$  – Wert der Benzoesäure in Wasser beträgt 4,2, in 1:1 Wasser/Methanol, 5,3. Eine derartige Verschiebung passiert typischerweise beim Gradienten und dieser Effekt erweist sich als stärker, wenn nicht vorgemischt wird, also Kanal 1, 100% A (z. B. Puffer oder angesäuertes Wasser) und Kanal 2, 100% B (z. B. Acetonitril oder Methanol), Ergebnis: Während der Gradientelution herrscht nicht nur ein Lösungsmittel- sondern auch ein pH-Wert-Gradient – im Falle vom Puffer als dritter, auch ein Salzgradient. Was kann die Folge sein, wenn der pH-Wert und dadurch beispielsweise auch der ionische Zustand einer polaren Komponente sich ändern? Trägt beispielsweise nun jene Komponente auf einmal eine Ladung (z. B. zweifache Ladung bei einem Protein oder einem amphoteren Stoff), verhält sie sich anders als andere (neutrale) Komponenten der Probe: Je nach Charakter der stationären Phase kann die Retentionszeit – und die Peaksymmetrie – zu- oder eben abnehmen. Oder aber eine Komponente liegt bei 40% A und einem bestimmten pH-Wert als Alkohol („Hydral“) und bei 10% A als Aldehyd vor, also haben wir eine pH-Wert-abhängige Gleichgewichtsverschiebung während des Gradientenlaufs. Analog sollte man auch an andere Gleichgewichte wie Monomer/Dimer, solvatisiert/nicht-solvatisiert oder Cyclisierung (z. B. Lactam-Bildung) sowie Hydrolyse denken. Schließlich kann durch Veränderung des Gradienten selbst (z. B. Anfangs- und End% B, Steilheit) auch eine Änderung des nach einer Zeit X herrschenden pH-Wertes stattfinden. Durch die Verschiebung des pH-Wertes kann ferner auch die UV-Absorption sich ändern, dadurch die

Peakfläche. Je nach Abhängigkeit kann in einer Probe diese Veränderung marginal oder merklich sein, als typische Substanzen, für solche Effekte empfindlich, wären zu nennen: Farbstoffe (z. B. Anthocyanate), Barbiturate, Ascorbinsäure, konjugierte, aromatische Kerne.

- Eine Temperaturänderung beeinflusst den pH-Wert; Je nach Art der Temperierung (Alublock vs. Umluftofen, Vorheizer ja/nein, Geometrie des Säulenofens) ergibt sich womöglich ein anderer pH-Wert, zu den Folgen, s. weiter oben. Daran sollte man beispielsweise beim Methodentransfer denken.
- Der pH-Wert der Probenlösung bleibt nicht konstant, mögliche Gründe: Die Matrix ist nicht immer gleich, z. B: Urinprobe morgens/abends, bzw. Proband hat Wasser/Coca-Cola getrunken, Plasmaprobe oder auch Kaffee ist frisch/alt, Konsequenz: Im ersten Fall „altert“ evtl. bei Raumtemperatur das Albumin und die Pufferwirkung geht verloren, im zweiten Fall ändert sich die Säurenkonzentration. Dass die Matrix bei Umwelt-, biologischen, Naturproben etc. eher als bei synthetischen Proben recht häufig schwanken kann, liegt auf der Hand.
- pH-Differenz zwischen Proben- und Standardlösung, dazu zwei Beispiele: 1. Peakform des Analyten in der Probenlösung wurde mit der Zeit schlechter; Peakform des Analyten in der Standardlösung auch über die Zeit sehr gut. Zugabe von Standardlösung zu der Probe: Peakform des Analyten blieb gut. Begründung: Der pH-Wert der Standardlösung war ein anderer als von der Probe, nach der Zugabe von Standardlösung zur Probe ergab sich ein anderer pH-Wert, dadurch wurde verhindert, dass der Analyt dissoziiert vorlag und somit wurden ionische Wechselwirkungen unterbunden. 2. Durch das Magnesiumcarbonat in der Probenlösung einer Tablette ergab sich ein anderer pH-Wert als wenn lediglich der Wirkstoff aufgelöst wurde, Retentionszeit und Peakform des Wirkstoffs in der Probe und im Standard waren unterschiedlich. Merke: auch eine kleine Veränderung des pH-Wertes in der Probenlösung kann dazu führen, dass der/ein Analyt in einer anderen Form vorliegt und dadurch sein chromatographisches Verhalten sich ändert.

Eine (nicht bewusst wahrgenommene) pH-Wert-Veränderung der Probenlösung und des Eluenten sowie eine pH-Wert-Differenz zwischen Standard- und Probenlösung können zu völlig falschen Ergebnissen führen. Manch´ eine fehlerhafte Schlussfolgerung kann hier ziemlich brisant sein (z. B. Arsenanalytik), wir werden in einem späteren Tipp darauf zurückkommen. Neben des pH-Wertes möchte ich gerne noch kurz auf drei Punkte zu sprechen kommen:

- Verweilvolumen der Apparatur; Durch ein unterschiedliches Verweilvolumen einer Gradientenanlage (Hochdruck-/Niederdruckmischung, unterschiedliches Schleifenvolumen im Autosampler) oder durch unterschiedliche Korrekturfaktoren für die Gradientenmischung kann sein, dass nach einer bestimmten Zeit X ab Injektion eine andere Eluentenzusammensetzung in der Säule herrscht. Und durch die unterschiedliche Eluentenzusammensetzung ergibt sich ein anderer pH-Wert, zu Konsequenzen, s. weiter oben. Das bedeutet, bei einem Methodentransfer kann passieren, dass nur eine Komponente „Probleme“ bereitet (nur jene liegt beispielsweise nach *dieser* Zeit ab Injektion ionisch vor), der Rest nicht.
- Manche Komponente in der Probe kann Komplexe bilden; Es kann nun gut sein, dass eine bestimmte stationäre Phase Metallionen in der Kieselgelmatrix enthält. Oder aber jene Metallionen befinden sich in der Probe (Kontrastmittel, Platinkomplexe, Kupfer-/oder Eisen-haltige Proben etc.) und mit der Zeit

reichern sie sich an der stationäre Phase an. Besagte Komponente geht nun mit den Metallionen Komplexe ein und diese große, oft solvatisierte Spezies eluieren sehr langsam von der stationären Phase, Ergebnis: Breite, tailende Peaks. Weitere Konsequenz: Wenn die Integrationsparameter der nun breiter gewordenen Peakform nicht angepasst werden (was im Alltag mangels Zeit der Normalfall ist) ergibt sich nicht nur eine „falsche“ Fläche für diese Komponente sondern auch ein größerer V<sub>k</sub> bei einer mehrfachen Injektion aus einem vial – bei den restlichen Peaks ist der V<sub>k</sub> zufriedenstellend, das heißt: Die Präzision der Peakflächen innerhalb eines Chromatogramms kann in einem solchen Fall recht unterschiedlich ausfallen.

- Durch einen niedrigen pH-Wert der mobilen Phase und/oder eine hohe Temperatur oder eine falsche Lagerung der Säule etc. kann im Falle von kleinen polaren funktionellen Gruppen an der Oberfläche der stationären Phase (CN, PFP, Phenyl Hexyl, Biphenyl, C1/C4 usw.) ein Teil dieser Gruppen abgespalten werden (Hydrolyse, „Bluten“ der Säule). Die Wechselwirkungen einer/mehrerer polaren Komponenten nehmen mit der nun größer gewordenen Anzahl der Silanolgruppen zu, Ergebnis: Zunahme der Retentionszeit, breite/tailende Peaks, Verschlechterung der Nachweisgrenze usw. – im Prinzip kann alles passieren, was wir weiter oben bereits diskutiert haben. Eine Änderung des Trennungsverhaltens von evtl. neutral vorhandenen Komponenten in der Probe ist so minimal, dass sie kaum auffällt.

## **Das Fazit**

Wenn nur einer oder einige Peak(s) in einem Chromatogramm Probleme bereiten, liegt eine Substanz-spezifische Ursache vor. Oft handelt es sich um eine unbeabsichtigte Veränderung des pH-Wertes während der Trennung oder um eine pH-Differenz zwischen Probenlösung und Eluent und/oder zwischen Probenlösung und Standardlösung. Schließlich ist nicht immer mit einer gleichbleibenden Matrix aus zu gehen. Als etwas seltenere, dennoch immer wieder vorkommende Fälle wären schließlich unterschiedliche Stabilitäten, die Komplexierung nur einer Komponente aus der Probe mit Metallionen an der stationären Phase oder aus der Anlage, oder eine minimale Veränderung der Oberfläche der stationären Phase auf die nur polare/ionische Komponenten merklich reagieren, zu nennen.