

Der HPLC-Tipp im Juli/August 2016

Die „Kleinen“ im Sommer – betrachten wir heute ein paar DAD- und MS-relevanten Themen

von Dr. Stavros Kromidas, Blieskastel

Zunächst erfolgen ein paar Hinweise zur LC/MS-Kopplung:

- Bekanntlich ist TFA (Trifluoressigsäure) ein häufiges, gern verwendetes Additiv – nicht nur in der LC/MS-Kopplung. Folgender Fall: Eluent A: 0,1 % TFA, Eluent B, 0,085% in ACN, Lösungen ein Monat alt, Behältnis aus Weißglas. Die Injektion einer verdünnten Probenlösung (pH-Wert = 7) führt zu einem fürchterlichen „Buckel“. Wird die Konzentration von TFA im Eluenten B ebenfalls auf 0,1 % erhöht, verschwindet der Buckel. Wird die Probenlösung mit Acetatpuffer versetzt ist der Buckel ebenfalls verschwunden - auch im Falle des ursprünglichen „0,085%igen Eluenten. Ebenso bei Erhöhung der Konzentration der Probenlösung. Es taucht schließlich auch kein Problem auf, wenn entweder Braunglas verwendet oder wenn das ursprüngliche Behältnis mit Alufolie ummantelt wird. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine pH-Wert-Verschiebung stattfindet, die entweder mithilfe von Puffer oder durch die gleiche Konzentration an TFA in den Eluenten A und B oder eben durch Abwenden der UV-Strahlung verhindert werden kann
- TFA führt zwar oft zu einer Verbesserung der Peakform, sie kann allerdings auch die Ionisierung herabsetzen, die Nachweisgrenze kann darunter leiden. Eine Alternative wäre für Substanzen um die 150 kDalton Trichloressigsäure
- Mit Methanol erreicht man oft die bessere Empfindlichkeit; für die Analyse jedoch von z. B. Boronsäuren ist Methanol ungeeignet, es entstehen Methylester. Eine Alternative wäre evtl. Isopropanol, natürlich in MS-Qualität (z. B. Sigma Aldrich)
- Wenn im Alkalischen gearbeitet werden soll (Nucleotide, starke Basen etc.) kommt bekanntlich TEA als Additiv infrage. Ein Eluent, der sich hier bewährt hat ist: Wasser, Methanol, TEA, Hexafluor-2-propanol.

Schauen wir uns nun einige Sachen an, wenn DAD und MS in Serie gekoppelt sind.

Vorbemerkung:

Es gibt einer Reihe von Fällen, in denen eine serielle Kopplung von Detektoren unabdingbar ist – sofern es um ein ernst gemeintes „sich-an-die-Wahrheit-herantasten“ geht. In einem zukünftigen HPLC-Tipp werden wir dieses Thema ausführlich besprechen.

Also: Nehmen wir an, eine Methode wurde ursprünglich mit dem DAD entwickelt, nun haben Sie zusätzlich ein MS in Serie geschaltet, weil Sie sich dadurch mehr Informationen erhoffen. Was könnte hier passieren?

- Mit der Zeit stellen Sie ein wachsendes Rauschen am DAD-Chromatogramm fest, die Basislinie beim MS ist einwandfrei. Mögliche Erklärung: Die Optik (Spiegel werden „blind“, Linsen werden trüb, Platinen sind mit Staub bedeckt) verschlechtert sich und das ist ein schleicher Prozess. Dieses DAD-Problem lässt das MS „kalt“, die Basislinie dort ist OK
- Die Basislinie beim DAD ist OK, am MS sehen Sie jede Menge zusätzliche Signale und/oder ein „unmögliches“ Rauschen. Mögliche Erklärung: Ihre stationäre Phase blutet – und das passiert nicht nur beim PFP-Material!, – dies ist nur am MS zu sehen
- Die Peakform ist beim DAD besser als am MS – oder umgekehrt. Wir sprechen hier nicht von der minimalen, meist harmlosen Peakverbreiterung durch die Verdünnung der Substanzzone aufgrund des längeren Weges (MS befindet sich ja nach dem DAD). Eine Verschlechterung/Verbesserung der Peakform hängt möglicherweise mit einer Veränderung des pH-Wertes und dadurch Verschiebung von Gleichgewichten im Falle von ionischen Komponenten zusammen. Eine minimale, jedoch signifikante Veränderung des pH-Wertes kann durch eine stärkere Verdünnung - bis eben die Probe am MS ankommt - resultieren. Oder aber durch eine Abnahme der Temperatur: Es ergibt sich ein negativer Temperaturgradient, Säulenausgang-DAD-MS, was ebenfalls zu einer Veränderung des pH-Wertes führen kann: In der DAD-Zelle befinden sich andere Spezies als im Moment des Eintretens der Komponenten in das MS-Interface. Oft kann diese Vermutung durch eine Erhöhung des pH-Wertes des Eluenten überprüft werden: Man verwende statt einer 0,1%-, nun eine 0,5%-igen TFA-Lösung
- DAD läuft ohne Probleme, das MS-Chromatogramm kann man „vergessen“. Mögliche Erklärung: Die Vakuumpumpe beim MS steigt bei über 35-40 °C aus

Zum Schluss kurz zu einem häufigen Problem beim Vergleich von Ergebnissen einer DAD- und einer MS-Methode.

- Bei der ursprünglichen LC-DAD-Methode werden mehrere Extraktionsschritte durchgeführt. Sie haben eine recovery von beispielsweise 60%. Bei der LC-MS-Methode wird nur ein Extraktionsschritt durchgeführt. Man denkt sich, das wird man es doch so machen können, denn die Matrix wird ja beim MS – da im vorliegenden Fall nicht ionisierbar - nicht „gesehen“, demnach störe sie nicht. Jetzt ergibt sich allerdings eine recovery von beispielsweise 80 oder 90%, weil der Substanzverlust durch „weniger“ Probenvorbereitung geringer ist. Oder aber eine UV-inaktive Verunreinigung wird am DAD nicht registriert, am MS jedoch schon, da sie ionisiert werden kann – oder umgekehrt. DAD liefert „in Spec“, MS eine „OOS“-Situation – oder umgekehrt.