

Der HPLC-Tipp im Mai/Juni

Die Kleinen im Sommer

Geisterpeaks – aber erst „später“ Verbesserung der Empfindlichkeit

Dr. Stavros Kromidas, www.kromidas.de

Geisterpeaks, die „später“ oder erst in einigen Tagen erscheinen

Geisterpeaks erscheinen meist plötzlich. Man wundert sich wieso, hat man doch an den chromatographischen Bedingungen nichts geändert. Nun, es sind schon einige Situationen denkbar, in denen Geisterpeaks erst nach einer gewissen Zeit zu sehen sind. Nachfolgend einige Beispiele dazu:

- *Katalytische Wirkung des Kieselgels*
 - Kieselgel ist ein guter Feststoffkatalysator; bei längeren Läufen werden womöglich nur solche Substanzen verändert, die lange an der Oberfläche des Materials haften und somit spät eluieren. Sind solche Substanzen in der Probe enthalten, so erscheinen evtl. Geisterpeaks. Fehlen diese Komponenten, eluieren nur Komponenten, die schwache Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, die Geisterpeaks fehlen
- *Verstärkt Hydrolyse durch ungewollte Veränderung chromatographischer Parameter*
 - Stellen wir uns eine lange Sequenz vor: bei den gegen Ende der Sequenz zu injizierenden Proben herrscht im vial evtl. eine andere Temperatur als bei den Proben davor (z. B. Temperaturdifferenz Kühlschrank-Probengeber oder Temperaturgradient im Probenraum des Probengebers)
 - Auch folgendes wäre im Falle einer langen Sequenz denkbar: der pH-Wert im vial ändert sich mit der Zeit – aus welchen Gründen auch immer – und ab einem bestimmten pH-Wert sind allerlei Veränderungen der Probe denkbar und somit erscheinen zusätzliche Substanzen erst nach einer gewissen Zeit
- *Oxidationsprodukte*
 - Man/frau arbeitet mit Tetrahydrofuran (THF) in der mobilen Phase; ein Blindgradient zu Beginn zeigt keine Probleme. Mögliche Peroxide aus dem THF sammeln sich allerdings erst mit der Zeit an der Säule und erscheinen nach einer Zeit X als Geisterpeaks gegen Ende des Gradienten. Man/frau wundert sich wieso erst nach so und so vielen Stunden bei den Nachtläufen Geisterpeaks auftauchen...
 - Trotz sicherlich Endreinigung der Dichtungen vor Auslieferung, kann eine Rest-Fettschicht auf deren Oberfläche vorhanden sein. Deren Oxidationsprodukten (z. B. N-Oxide) können als Geisterpeaks erscheinen, die Anzahl und der Zeitpunkt kann von der Arbeitsweise abhängig sein: Anzahl der Läufe, Temperatur, Eluent, Zusammensetzung der mobilen Phase bei der Lagerung usw.
- *Auffüllen des Vorratsgefäßes*

In Acetonitril können Polymere entstehen. Wird das Vorratsgefäß stets aufgefüllt sobald ca. die Hälfte des Lösungsmittels aufgebraucht ist, gibt es keine Probleme, deren Konzentration ist gering. Erfolgt das Auffüllen nicht immer zum gleichen Zeitpunkt, kann passieren, dass bei geringer Flüssigkeitsmenge im Vorratsgefäß die Polymer-Konzentration derart hoch ist, dass neben „Wellen“ in der Basislinie

auch Geisterpeaks erscheinen. Also frei nach Giovanni Trapattoni: „Flasche voll: Keine Probleme, Flasche (fast) leer: Probleme

Verbesserung der Empfindlichkeit

Über das Thema haben wir uns an dieser Stelle bereits mehrfach unterhalten. Da es wichtig ist, möchte ich weiter unten die aus meiner Sicht effektivsten Maßnahmen verdichtet zusammenfassen. Das Ziel lautet: Möglichst große, schmale, symmetrische Peaks.

1. Optimale Bedingungen bezüglich Hard- und Software:

- *Geringes Dispersionsvolumen (vereinfacht: Totvolumen)
- Notwendig bei bestimmten Analyten: Inerte/Bio-inerte/Metall-freie Anlage *und* inerte bzw. Peek-ummantelte Säule, silanisierte vials
- *Falls möglich, mit Luftsegmenten zwischen Probengeber und Säule arbeiten, um eine Verdünnung der Substanzzone zu verhindern
- *Optimale Settings, z. B. mindestens 40 Datenpunkte, 16 nm Spalt, 50 ms Zeitkonstante, Rauschen-Unterdrückung
- Je nach verwendeter Detektionsart und Analyt-Stabilität das technisch maximal Machbare nutzen, z. B: Max-Light/LightPipe (UV), Triple Quad MS (LC-MS), ICP-MS

2. Chromatographische Parameter:

- Nach Möglichkeit kurze, in jedem Fall dünne Säulen; wenn die Voraussetzungen gegeben sind, evtl. auch an Kapillaren denken
- Core Shell- (1,3-1,7 μm) oder falls es porös sein muss, Sub2 μm -Material
- *Stets schwächeres Probelösungsmittel im Vergleich zum Anfangsgradienten verwenden: Anreicherung der Substanzzone am Säulenkopf; ggf. mit Hilfe eines Schaltventils Anreicherung in einer Trap-Säule in Erwägung ziehen
- *Steiler Gradient mit 30-40 % B beginnend
- *Bei thermostabilen Komponenten tendenziell bei höheren Temperaturen chromatographieren

Die mit „*“ versehenen Maßnahmen sind relativ schnell umzusetzen, der Rest ist mit einem gewissen Aufwand verbunden, der Nutzen kann nur individuell bewertet werden.