

Unpolare SPE / Probenvorbehandlung: pH-Wert Einstellung

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 7. Oktober 2008)

Eine der am häufigsten angewendeten Probenvorbereitungstechniken ist sicher die Festphasenextraktion (SPE) mit unpolarem Sorbens (C18, Polymer). Eine typische Methode, die auf diesem Mechanismus basiert, ist die Extraktion von Wirkstoffen aus biologischer Matrix (Plasma, Serum), z.B.:

- SPE-Material: Bond Elut Plexa 10 mg (96 well)
- Probenvorbehandlung:
 - Saure Wirkstoffe:
 - 100 µL Plasma/Serum
verdünnen mit 300 µL 1% Ameisensäure
 - Basische Wirkstoffe:
 - 100 µL Plasma/Serum
verdünnen mit 300 µL 2% Ammoniak
- Konditionierung:
 - 500 µL Methanol
 - 500 µL Wasser
- Probenaufgabe:
 - vorbereitete Probe aufgeben, langsam durchlaufen lassen
- Waschen: 500 µL 5% Methanol in Wasser
- Elution: 500 µL Methanol

Bond Elut Plexa ist übrigens ein polar funktionalisiertes Polymermaterial der neuesten Generation, das aufgrund seiner starken Wechselwirkungen einen weiten Bereich an Analyten abdeckt und dabei hohe Wiederfindungsraten und besonders reine Extrakte liefert.

Möglich ist dies durch eine neuartige Porenstruktur, die unter anderem endogene Proteine ausschließt sowie einen Polaritätsgradienten aufweist.

(Detailliertere Informationen zu Bond Elut Plexa finden Sie auf der [Varian Inc. Webseite](http://www.varian.com) oder bei der Varian Deutschland GmbH (Kontakt Daten siehe oben). Dort erhalten Sie auch kostenlose Musterkartuschen aller Varian SPE-Materialien.)

Warum wird nun für saure und basische Substanzen die Zugabe von Säure bzw. Base empfohlen?

Der zugrundeliegende Mechanismus basiert auf unpolaren (van der Waals'schen) Wechselwirkungen. Je unpolarer der Analyt ist, umso stärker sind diese Wechselwirkungen. Jede funktionelle Gruppe (z.B. Alkohol, Amin, Aldehyd, Keton, Säure etc.) trägt aber zur Polarität des ganzen Moleküls bei. Je mehr davon vorhanden sind, desto stärker polar bzw. desto weniger unpolar ist die Substanz. Einen besonders starken Einfluss haben dabei ionische, also geladene Gruppen.

Glücklicherweise kann man so manche ionische Gruppe durch Änderung des pH-Wertes beeinflussen, und zwar schwach saure und schwach basische Gruppen.

Wie war das noch mal mit den Säuren und Basen?

Eine **schwache Säure**, z.B. eine Carbonsäure $R-COOH$ steht in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit ihrer sog. korrespondierenden Base, im Beispiel dem Anion $R-COO^-$. Die Lage des Gleichgewichts (d.h. die Konzentrationsverhältnisse) wird beschrieben durch die Säurekonstante pK_a (= pK_s). Da nach der Puffergleichung (nach Henderson-Hasselbalch) die Konzentrationen der Säure und des Anions gleich sind, wenn der pH-Wert der wässrigen Lösung gleich dem pK_a -Wert ist, lässt sich einfach herleiten, wie man den pH-Wert ändern muss, um die reine Säure oder das reine Anion zu erhalten.

Ein einfaches Beispiel: Essigsäure



Bei pH 4,75 ist $C(CH_3-COOH) = C(CH_3-COO^-)$.

- Möchte man mehr Säuremoleküle, gibt man Säure zu, erniedrigt also den pH-Wert.
- Möchte man mehr Moleküle der Base (hier: des Anions), entfernt man die H^+ -Ionen durch Zugabe von Base bzw. Erhöhung des pH-Werts.

Wichtig dabei: um die Moleküle **vollständig** in eine der beiden Formen zu überführen, muss der **pH-Wert** um mindestens **2 Einheiten vom pK_a -Wert abweichen**.

Beispiel Essigsäure:

- **reine Säure** CH_3-COOH liegt vor bei niedrigem pH, und zwar bei $pH = pK_a - 2 = 4,75 - 2 = 2,75$ und darunter ($\leq 2,75$)
- **reines Anion** (Acetat, Base) liegt vor bei höherem pH, und zwar bei $pH = pK_a + 2 = 4,75 + 2 = 6,75$ und darüber ($\geq 6,75$).
- Zwischen pH 2,75 und pH 6,75 kommen beide Formen nebeneinander vor

Das gleiche gilt für **schwache Basen**, z.B. $R-NH_2$. Auch für Basen ist die Säurekonstante pK_a definiert, wobei in diesem Fall $R-NH_3^+$ die zugehörige Säure darstellt. Die **Dissoziationsgleichung** sieht folgendermaßen aus: $R-NH_3^+ \leftrightarrow R-NH_2 + H^+ \quad pK_a \text{ ca. } 9$

Analog zum Essigsäurebeispiel kann man ableiten:

- reine „Säure“, also **das protonierte Amin** $R-NH_3^+$, liegt vor bei niedrigem pH, und zwar bei $pH = pK_a - 2 = 9 - 2 = 7$ und darunter (≤ 7)
- reine Base, also **undissoziiertes Amin**, liegt vor bei höherem pH, und zwar bei $pH = pK_a + 2 = 9 + 2 = 11$ und darüber (≥ 11).
- Zwischen pH 7 und pH 11 kommen beide Formen nebeneinander vor

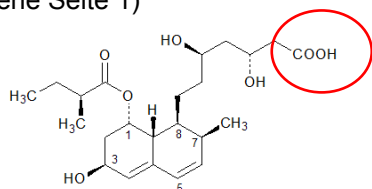
Unpolare SPE / Probenvorbehandlung: pH-Wert Einstellung

(veröffentlicht auf www.analytik-news.de am 7. Oktober 2008)

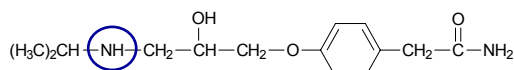
Was bedeutet dies nun für die unpolare SPE?

Damit die **Analyten** maximale hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Sorbens eingehen können, sollte man den pH-Wert so einstellen, dass die ionisierbaren funktionellen Gruppen undissoziiert, also **ungeladen** vorliegen, d.h.

- **Säuren** werden protoniert (**sauer**), **pH ≤ pKa - 2**
 - pH-Einstellung z.B. mit Ameisensäure oder Phosphorsäure
 - **Beispiel:** Pravastatin (Medikament zur Senkung des Cholesterinwertes im Blut), pKa 4,6 (Methode siehe Seite 1)



- **Basen** werden deprotoniert (**basisch**), **pH ≥ pKa + 2**
 - pH-Einstellung z.B. mit Ammoniak
 - **Beispiel:** Atenolol (Betablocker), pKa 9,6 (Methode siehe Seite 1)



Was tun, wenn man den pKa-Wert nicht kennt?

Im Internet wird man häufig fündig, ansonsten zunächst beide Standardmethoden (Seite 1) testen.

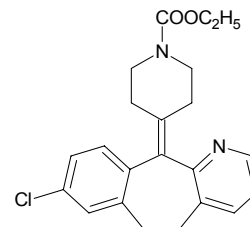
Muss man den pH-Wert der Probe denn auf jeden Fall einstellen?

Das hängt im Prinzip von der Polarität des ganzen Moleküls ab. Wenn der Rest hydrophob genug ist, kann auch ein geladenes Molekül ausreichend retardiert werden.

Die **Polarität** einer Substanz lässt sich abschätzen über den **Log P**-Wert (= Logarithmus des Verhältnisses der Konzentrationen einer Substanz bei der Verteilung/Extraktion zwischen n-Octanol und Wasser).

- **Sehr unpolare Substanzen** haben einen **Log P > 3**, d.h. bei der Extraktion einer wässrigen Phase mit n-Octanol wäre am Ende die Konzentration des Stoffes in der organischen Phase mehr als 1000 mal größer als in der wässrigen Phase.
- **Sehr polare Substanzen** haben einen **Log P < 1**, d.h. bei der Extraktion der Substanz aus wässriger Lösung mit n-Octanol würden mehr als 10% der Substanz in der wässrigen Phase bleiben.
Je kleiner Log P, desto mehr bleibt in der wässrigen Phase.

Eine Substanz wie das Antihistaminikum Loratadin mit einem Log P von 5,2 macht sicher keine Probleme.



Auch Atenolol (Abb. siehe linke Spalte) ist noch nicht sehr kritisch, trotz Log P von 1,3. (Pravastatin: Log P 2,6)

ABER: Man darf die Probenmatrix nicht vergessen !!

Die Analyten liegen nicht isoliert vor, sondern in einem Gemisch mit einer Vielzahl von Substanzen, die teilweise im Überschuss vorliegen und mit den Analyten um die Adsorptionsplätze an der Oberfläche des SPE-Sorbens konkurrieren.

ALSO:

- **pH-Wert Einstellung als Sicherheitsmaßnahme** für maximale Wiederfindung

Aber keine Regel ohne Ausnahme:

Es kann auch den **umgekehrten Fall** geben, dass eine **Substanz viel zu stark festgehalten** wird und sich nicht gut eluieren lässt.

- Dann kann man den umgekehrten Weg gehen und den pH-Wert so einstellen, dass die Substanz ionisch vorliegt, um die Elution zu erleichtern.

Was tun, wenn saure und basische Analyten mit einer Methode erfasst werden sollen?

- Beide Standardmethoden testen, vielleicht sind die Säuren und/oder die Basen hydrophob genug, um mit der jeweils anderen Methode erfasst zu werden.
- Oder besser: **Bond Elut Plexa PCX** nehmen, eine „Mixed-Mode“-Phase, die im Säuren die Säuren über unpolare Wechselwirkungen und die Basen über Kationenaustausch festhält. (Mehr dazu in einer der nächsten Folgen.)

Varian Applikationen:

[SI-0602: Extraction of Acidic Drugs from Plasma with Polymeric SPE Sorbent Bond Elut Plexa](#)

[SI-0603: Extraction of Basic Drugs from Plasma with Polymeric SPE Sorbent Bond Elut Plexa](#)