

In diesem Teil sind alle Ergebnisse zusammengefasst

Hydrophober/polarer Charakter der Säulen

In **Abbildung 1** und **Abbildung 2** sind die untersuchten Säulen nach abnehmendem hydrophoben Charakter (genauer: nach abnehmender hydrophoben Selektivität) dargestellt. So eignen sich beispielsweise Säulen auf der linken Seite der Abbildungen 1 und 2 gut für die Trennung von neutralen (z. B. Aldehyde, Ketone, einkernige, kleine Aromaten, homologe Reihen) bzw. von über den pH-Wert neutralisierten Analyten (schwache organische Säuren und Basen). Säulen auf der rechten Seite der Abbildungen 1 und 2 hingegen zeigen eine gute polare und sterische Selektivität. Beispiele für die Eignung diverser RP-Typen finden sich im Abschnitt ‚Eignung von RP-Materialien für bestimmte Analyttypen‘.

In einem in der Zeitschrift ‚Laborpraxis‘ erschienenen Artikel werden zwei einfache Tests zur Charakterisierung von RP-Phasen beschrieben. Aus den Ergebnissen bei der Trennung unterschiedlicher Analyte an diversen Säule-Eluent-Kombinationen lassen sich die untersuchten Säulen grob in eher hydrophobe RP-Phasen bzw. eher polare RP-Phasen einteilen.

Ähnlichkeit von RP-Säulen

Es existieren mehrere Möglichkeiten, die Ähnlichkeiten von RP-Säulen zu visualisieren. Zwei aussagekräftige Tools sind die **Selektivitätskarten** und die **Selektivitätshexagone**.

Vorbemerkungen

In den nachfolgenden Ausführungen wird als Kriterium für die Ähnlichkeit von RP-Materialien ausschließlich die Selektivität [Trennfaktor α (in den Abbildungen a geschrieben)] bei der Trennung unterschiedlicher Analyte verwendet. Selbstverständlich können sich bei anderen chromatographischen Bedingungen und anderen Substanzklassen andere ‚Ähnlichkeiten‘ ergeben. Die Verwendung jedoch recht unterschiedlicher Analyttypen bei mehreren Säule-Eluent-Kombinationen dürfte dennoch zu einer allgemeingültigen Aussage führen. Auf die Berücksichtigung weiterer Kriterien wie Retentionsfaktor k oder Bodenzahl N wird hier verzichtet, weil der k -Wert aus Anwendersicht keine so hohe Priorität besitzt und N von vielen Faktoren abhängt. Nur eine sehr aufwendige und nicht unumstrittene Normierung erlaubt, einigermaßen brauchbare Aussagen bezüglich der Bodenzahl zu gewinnen.

Selektivitätskarten

In **Abbildung 3**, **Abbildung 4** und **Abbildung 5** sind ca. 90 kommerzielle Säulen in Gruppen mit ähnlichem Charakter zusammengefasst: Säulen der Gruppe A weisen einen eher hydrophoben, Säulen der Gruppe B einen eher polaren/mittelpolaren und Säulen der Gruppe C einen ausgeprägt polaren Charakter auf.

Beispiele für die Anwendung einer Selektivitätskarte

- Man hat im Zuge einer Methodenentwicklung z. B. YMC Pro C18 (siehe

Abbildung 3, Gruppe A) mit mäßigem Erfolg getestet. Es ist fraglich, ob eine Säule, die ähnliche Eigenschaften aufweist, wie z. B. Discovery C18, eine wesentlich bessere Trennung ermöglicht. Mit einer Säule aus der Gruppe B (z. B. LiChrospher) oder gar Gruppe C (z. B. Synergi POLAR RP) hätte man vermutlich die größeren Chancen.

- LiChrospher Select B (ReproSil ODS 3), die Sie für eine Routinemethode verwenden, ist zur Zeit nicht lieferbar. Eine alternative Säule, mit der Sie wahrscheinlich eine ähnliche Trennung erzielen könnten, wäre z. B. Superspher Select B (ProntoSil C18).
- Orthogonale Tests (gleiche Säule und anderer Eluent oder gleicher Eluent und andere Säule) sind ein hervorragendes Tool, um die Peakhomogenität zu überprüfen. Je weiter nun eine Säule von der aktuell sich im Einsatz befindenden in der Selektivitätskarte entfernt anzutreffen ist, um so ‚geeigneter‘ wäre sie für ein derartiges Experiment; hierzu zwei Beispiele:

1. **Abbildung 6** zeigt die Trennung von Uracil, zwei schwachen Säuren (neutral vorliegend) und Propranolol an zwei Säulen. Das obere Chromatogramm gibt die Trennung an Discovery Amide C16, einer polaren Säule aus der Gruppe C, das untere Chromatogramm die Trennung an Discovery C18, einer hydrophoben Säule aus der Gruppe A, wieder. Die zwei schwachen, neutral vorliegenden Säuren sind nur am hydrophoben Material zu trennen.

2. Bei der Trennung von Metaboliten von tricyclischen Antidepressiva eluiert eine polare Verunreinigung an allen klassischen, hydrophoben Säulen aus der Gruppe A (**Abbildung 5**) inert, so auch an SunFire, oberes Chromatogramm, **Abbildung 7**. Erst die Verwendung von Primesep C, einer C18-Säule mit einem zusätzlich eingebauten komplexfähigen Liganden (siehe Gruppe C, **Abbildung 5**) ermöglicht das Retardieren und damit die Quantifizierung dieser polaren Verunreinigung. Wir haben mehrere spezifische Selektivitätskarten erstellt. Mit ihrer Hilfe kann die Ähnlichkeit der Säulen bezüglich ihrer Trenneigenschaften für ganz bestimmte Substanzklassen ermittelt werden.

Hydrophobe/aromatische Selektivität

Abbildung 8: Eine gute hydrophobe Selektivität zeigen hydrophobe Phasen wie z. B. Luna, Symmetry, Prodigy, Synergi MAX RP. Über eine gute aromatische Selektivität (Trennung ‚großer‘, hydrophober Aromaten - hier Chrysen/Perylen) verfügen dagegen Phasen mit polaren Gruppierungen an der Oberfläche wie z. B. Platinum EPS, Discovery Amide C16, Supelcosil ABZ PLUS oder Spherisorb ODS 1. Eine gute Selektivität für beide Fragestellungen schließlich weisen Phasen auf, die sowohl über eine ausreichend starke Belegung mit C18-Alkylketten (Kohlenstoffbeladung) als auch über aktive polare Gruppen, wie z. B. Silanolgruppen, verfügen: LiChrospher, Superspher, Purospher, MP-Gel.

Saure/basische Selektivität

Starke aromatische Säuren *und* organische Basen, die allerdings undissoziiert vorliegen, siehe **Abbildung 9**.

Für die Trennung von undissoziiert vorliegenden starken Säuren sind polare

Gruppen an der Oberfläche der stationären Phase vonnöten; die gute Selektivität von Spherisorb ODS 1 und Platinum EPS ist auffallend. Im alkalischen Puffer werden die Basen im Wesentlichen über hydrophobe Wechselwirkungen (es sind keine starken notwendig) getrennt; große Selektivitätsunterschiede sind nicht festzustellen. Somit ergibt sich, dass auch hier eher polare Phasen wie LiChrospher- und Superspher Select B, Nucleosil Protect 1 und Zorbax SB C8 für beide Substanzklassen einen guten Kompromiss darstellen.

Polare Selektivität, Wasserstoffbrückenbindung

Wenn tatsächlich polare Wechselwirkungen - welche auch immer - für eine Trennung notwendig sind, erweisen sich hydrophobe Phasen wie erwartet als weniger geeignet: Alle untersuchten hydrophoben Phasen zeigen eine äußerst dürftige Selektivität, auch eine Differenzierung unter ihnen ist kaum möglich, siehe **Abbildung 10**. Die polaren Phasen dagegen weisen eine gute polare Selektivität auf, auch eine Abstufung des polaren Charakters ist durch diese Darstellung gut zu erkennen.

Selektivitätshexagone

Bei den Selektivitätshexagonen werden die Säulen als Sechsecke dargestellt, wobei die sechs Ecken normierten Trennfaktoren (α -Werten) bei der Trennung bestimmter Analytpaare entsprechen.

Beispiel für die Anwendung eines Selektivitätshexagons

Man betrachte in **Abbildung 11** den Ausschnitt aus einem Selektivitätshexagon für die Trennung von Aromaten.

- Es ist leicht zu erkennen, dass z. B. Discovery C18, Hypersil BDS, Inertsil ODS 2 und Jupiter recht ähnliche Phasen darstellen, wenn es um die Trennung von aromatischen Verbindungen geht: Die α -Werte bei der Trennung unterschiedlicher aromatischer Verbindungen an diesen Säulen sind sehr ähnlich, es ergeben sich gleich aussehende Hexagone.
- Sie suchen eine geeignete Säule für die Trennung einer konkreten Substanzklasse, z. B.: "Welche Säule ist 'gut' für die Trennung von starken, aromatischen Säuren?" Man kann nun den Hexagonen entnehmen, dass an den polaren Säulen, z. B. Discovery Amide C16 und LiChrospher Select B sowie an der Phase Gromsil CP (Polymerschicht an der Oberfläche), sich ein großer Trennfaktor α bei der Trennung der zwei starken Säuren Terephthalsäure/Phthalsäure (α Tere/Phtal) ergibt. Schwach aromatische Säuren wie 4-Hydroxy-/3-Hydroxybenzoesäure (α 3/4 OH) werden an hydrophoben RP-Phasen wie z. B. Discovery C18 und Hypersil BDS gut getrennt.
- Sie möchten Proben mit recht unterschiedlichen aromatischen Komponenten analysieren. Sie suchen also nach einer 'Universalsäule' für Aromaten, d. h. eine Säule, die in der Lage ist, möglichst unterschiedliche aromatische Verbindungen selektiv zu trennen. Je symmetrischer nun ein Hexagon ist, umso universell einsetzbar wäre die entsprechende Säule für diese Fragestellung. Im vorliegenden Beispiel wären LiChrosorb und LiChrospher zwei dafür geeignete Säulen. Ist die sterische Selektivität nicht von Relevanz (Trennung von planaren/nicht planaren Molekülen, α

Triph/o-Ter), so wäre Gromsil CP eine ‚universal‘ einzusetzende Säule. Ist darüber hinaus eine gute Selektivität für stark aromatische Säuren ebenso unwichtig, kämen alle hydrophoben Phasen in Frage, siehe die Ausführungen weiter oben.

- Der Vergleich von Selektivitätshexagonen ermöglicht ferner die gezielte Auswahl von geeigneten Säulen für orthogonale Tests (unterschiedliche Eigenschaften von Säulen und damit unterschiedliche Mechanismen möglich).

Beispiel: Selektivitätshexagone von 23 neueren Säulen

In **Abbildung 12** und **Abbildung 13** sind Selektivitätshexagone abgebildet, die das Selektivitätsverhalten von 23 neueren Säulen und als Vergleich auch von Spherisorb ODS 2 für unterschiedliche aromatische Verbindungen wiedergeben. In Abb. 12 sind die Säulen alphabetisch, in Abb. 13a und Abb. 13b ihrer Ähnlichkeit entsprechend sortiert. Es wurden folgende Analyte untersucht:

α Per/Chr

Aromatische Selektivität (Trennung ‚großer‘, unsubstituierter, hydrophober Aromaten, Perylen/Chrysen)

α Triph/o-Ter

Sterische Selektivität (Trennung planarer/nicht planarer Moleküle, sterisch anspruchsvoller Moleküle wie Stellungsisomere, Steroide, verdrillte Stukturen, Triphenylen/o-Terphenyl)

α EB/FI

Hydrophobe Selektivität (Trennung über den hydrophoben Charakter, Methyl-Gruppe vs. C=O-Gruppe, Ethylbenzol/Fluorenol)

α Normetanephrin/Epinephrin

Hydrophobe Selektivität (Trennung von Aminen über den hydrophoben Charakter)

α Terepht/Phtal

Selektivität für starke aromatische Säuren, Terephthal-/Phthalsäure

α Nicotinsäure/Ascorbinsäure

Selektivität für eher schwache aromatische Säuren

Aus **Abbildung 12** und könnte man nun beispielhaft folgendes festhalten:

- Von den drei untersuchten ‚C16-Phasen‘ sind Ascentis RP-Amide und Discovery Amide C16 polarer als Acclaim PA C16 (siehe **α** Terepht/Phtal), genauer: Sie verfügen über polare Gruppen, die ionische - welche auch immer - Wechselwirkungen mit starken Säuren eingehen können und damit eine gute Selektivität ermöglichen; Acclaim PA C16 dagegen zeigt eine bessere sterische Selektivität.
- Acclaim PA C18 ist nur unwesentlich hydrophober als Acclaim PA C16 (siehe nur minimal bessere Selektivität für **α** Nicotinsäure/Ascorbinsäure und **α** Normetanephrin/Epinephrin).
- Uptispher UP5MM1 und Nucleodur Sphinx an erster Stelle sowie Primesep C an zweiter Stelle scheinen gute ‚Universalsäulen‘ für unterschiedliche

aromatische Verbindungen zu sein - siehe recht symmetrische Hexagone.

- Synergi FUSION-RP ist geringfügig polarer als SunFire: Die Selektivität für Terepht/Phtal ist etwas besser, die für Nicotinsäure/Ascorbinsäure sowie EB/FI etwas schlechter als bei SunFire.

Wenn man sich etwas intensiver mit dieser Darstellungsart beschäftigt und die in den Hexagonen erhaltenen Informationen mit Befunden aus anderen Experimenten in Bezug setzt, können recht detaillierte Rückschlüsse auf den Charakter und die Anwendbarkeit von Säulen gezogen werden. Das sei nachfolgend demonstriert, wobei betont werden muß, dass selbstverständlich eine wesentlich umfangreichere Diskussion möglich ist. Eine solche würde jedoch den hier beabsichtigten Umfang bei weitem sprengen.

Man betrachte zunächst **Abbildung 13a**, dort sind RP-Phasen mit eher polarem Charakter aufgeführt (Hypersil GOLD verfügt über einen 'dualen' Charakter, siehe weiter unten).

- Der komplexfähige Ligand bei Primesep C100 bzw. die polare Gruppe bei Ascentis RP Amide - beide befinden sich an der Alkylkette - verleihen den zwei Phasen eine sehr gute Selektivität für die Trennung von starken aromatischen Säuren (siehe α Terepht/Phtal).
- Durch die stärker 'organische' Vernetzung bei XBridge Shield C18 im Vergleich zu XTerra ergibt sich beim ersteren Material ein hydrophoberer Charakter: XTerra zeigt die bessere Selektivität für Per/Chr und Terepht/Phtal. Andererseits werden stärkere, teilweise ionisch vorliegende basische Komponenten an der XBridge-Matrix mit einer wesentlich besseren Peaksymmetrie eluiert.
- Zu Vergleichszwecken wurde auch das ältere, endcappte Spherisorb ODS2 untersucht. Das Endcapping 'eliminiert' zwar einen großen Teil der 'aggressiven' Silanolgruppen. Dennoch bleiben 'genügend' übrig, um zusammen mit den vorhandenen Metallionen in der Kiesegelmatrix eine gute Selektivität für Terepht/Phtal und eine - zumindest vorhandene - für Triph/o-Ter (sterische Selektivität) zu zeigen. Der polare Charakter offenbart sich gerade bei diesen zwei Trennungen, ansonsten sieht sein Hexagon den Hexagonen der hydrophoben Materialien aus Abb. 13b ähnlich aus.
- Hypersil GOLD verfügt sowohl über einen hydrophoben - siehe die gute Selektivität für α Per/Chr - als auch über einen polaren Charakter, siehe Selektivität für Terepht/Phtal.

In **Abbildung 13b** befinden sich Hexagone von hydrophoben RP-Phasen, die Bandbreite ist jedoch merklich:

- Atlantis dC18, YMC Pro C18 RS und Polaris C18-A sind mehr oder weniger hydrophobe Materialien. Atlantis dC18 zeigt aufgrund der geringen Belegung einen polareren Charakter als YMC Pro C18 RS, vergleiche die bessere Selektivität für α Per/Chr. Der Trennfaktor α EB/FI dagegen ist an YMC Pro C18 RS größer. Polaris C18-A ist wegen der eingebauten polaren Gruppe am Alkylrest polarer als die zwei Erstgenannten, der Trennfaktor α Per/Chr ist am größten. Die eingebaute polare Gruppe weist allerdings keinen ausgeprägt ionischen Charakter auf, der Trennfaktor α Terepht/Phtal ist nicht besonders groß. Das ist jedoch bei Uptisphere

UP5MM1 der Fall.

- Synergi Hydro RP **Abbildung 14** ist sowohl hydrophober als auch polarer im Vergleich zu Synergi FUSION RP: Hydrophobe aber auch polare Analyten werden an Erste selektiver getrennt.
- Die zu den C18-Borsten zusätzlich vorhandene kurze Alkylkette mit der Phenyl- Endgruppe bei Nucleodur Sphinx RP ‚reicht‘ zwar nicht für eine gute Selektivität bei der Trennung von starken aromatischen Säuren (α Terephth/Phtal) aus, beschert jedoch dem Material eine hervorragende sterische Selektivität, siehe α Triph/o-Ter.
- Der bifunktionale Charakter einer Phase (z. B. zusätzliche Ionenaustauschergruppe bei Uptisphere UP5MM1, kurze Alkylkette mit einer Phenyl-Endgruppe bei Nucleodur Sphinx RP) scheint eine wichtige Voraussetzung zu sein, um der Phase eine ‚Universalität‘ bezüglich Selektivität für unterschiedliche aromatische Verbindungen zu verleihen - siehe die Symmetrie bei beiden Hexagonen in **Abbildung 14** bzw. **Abbildung 13b**.

Man betrachte in diesem Kontext auch **Abbildung 17** (Kommentierung zu **Abbildung 16** und **Abbildung 17** siehe weiter unten im Text): In Übereinstimmung mit den eben besprochenen Zusammenhängen auf Basis der Hexagone findet sich beispielsweise YMC Pro C18 RS auf der rechten Seite von **Abbildung 17**: Das Material verfügt über eine ‚homogene‘ Oberfläche, auf der ‚eine‘ funktionelle Gruppe bei der Wechselwirkung mit den Analyten dominiert, und damit ergibt sich ein einheitlicher Mechanismus. In der Mitte etwa trifft man auf Polaris C18-A und Spherisorb ODS 2 (polare Gruppe an der Alkylkette bzw. zwar vorhandene dennoch wenige acide Silanolgruppen), weiter auf Nucleodur Sphinx RP (zusätzliche polare Gruppen, die etwas ‚aktiver‘ am Wechselwirkungs-Geschehen teilnehmen). Auf der linken Seite der **Abbildung 17** findet sich eine Reihe von EPG-Phasen mit ausgesprochen polaren Gruppen in ihrer Alkylkette bzw. Primesep A/C. Letztere sind Phasen mit einer ionischen EPG bzw. mit einem komplexfähigen Liganden im Alkylrest. Man kann sich leicht vorstellen, dass durch diese Gruppen ein Mischmechanismus in jedem Falle möglich ist.

Als letzte der besprochenen Phasen im Ranking der **Abbildung 17** ist Uptisphere UP5MM1 anzutreffen, eine bifunktionale Phase, die zwei sehr unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweist: Hydrophobe Alkylkette und eingebaute hydrophile Ionenaustauschergruppe.

In **Abbildung 15** werden noch einmal zum Vergleich sechs Hexagone dargestellt, die unterschiedliche ‚RP-Typen‘ vertreten. In Klammern wird beispielhaft ein typisches Selektivitätsmerkmal des entsprechenden ‚RP-Typus‘ erwähnt:

- Ascentis RP-Amide: Stark polare eingebaute Gruppe (ionische Wechselwirkungen möglich, gute Selektivität für polare, aber auch für ionisch vorliegende/sehr polare Analyte).
- XBridge Shield C18: Eingebaute polare Carbamatgruppe (recht gute Selektivität für polare und für sterisch anspruchsvolle Analyte).
- XBridge Shield C18: Sehr hydrophobe, gut abgedeckte Oberfläche (sehr gute hydrophobe Selektivität).

- Hypersil GOLD: ‚Mittlerer‘ Charakter: Sowohl ionische - keine starke - als auch hydrophobe - recht starke - Wechselwirkungen möglich (kombiniert in gewissem Grade die Eigenschaften der zwei letztgenannten RP-Phasen).
- Nucleodur Sphinx RP: Zusätzliche, kurze Alkylkette mit einer Phenyl-Endgruppe, schwach hydrophober Charakter (hervorragende sterische Selektivität).
- Uptisphere UP5MM1: Stark hydrophobe Alkylkette *und* stark polare funktionelle Gruppe vorhanden (keine ‚Spitzenselektivität‘ für einzelne Substanzklassen - siehe als Vergleich α Terepht/Phtal bei Ascentis RP-Amide, α EB/FI bei XBridge Shield C18 oder α Triph/o-Ter bei Nucleodur Sphinx RP - aber ein interessanter ‚Universalcharakter‘).

Homogenität der Oberfläche, Selektivitätsplots (‚ α ‘ vs. ‚ α ‘-Auftragungen), Ergebnisse aus Van-Deemter-Kurven

Wir haben uns im Rahmen dieser Arbeit auch mit Experimenten befasst, die ein recht differenziertes Bild bezüglich Ähnlichkeiten von RP-Materialien ermöglichen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch grundsätzlicher Natur und - da recht detailliert - wahrscheinlich nur für eine kleine Gruppe von Anwendern interessant. Nachfolgend werden einige Ergebnisse und Zusammenhänge stichwortartig vorgestellt:

1. In **Abbildung 16** und **Abbildung 17** sind die RP-Phasen nach abnehmender Inhomogenität der RP-Oberfläche sortiert.

Säulen auf der linken Seite der beiden Abbildungen verfügen über unterschiedliche funktionelle Gruppen auf der Oberfläche, die am Wechselwirkungsgeschehen aktiv teilnehmen, z. B. apolar *und* polar/ionisch - damit herrscht ein Misch-Wechselwirkungsmechanismus.

Säulen auf der rechten Seite der Abbildungen 16 und 17 weisen entweder eine homogene, monofunktionale Oberfläche auf oder aber jene enthält unterschiedliche Gruppierungen, die allerdings keinen diametral ‚anderen‘ Mechanismus erlauben: Bei solchen Materialien dominiert meist *eine* funktionelle Gruppe - und damit *e/n* Mechanismus bei der Wechselwirkung mit den Analyten.

In **Abbildung 18** werden die Trennfaktoren bei der Trennung Homovanilinessigsäure/5-Hydroxyindol-3-Acetonsäure dargestellt, das Ranking gibt den abnehmenden hydrophoben Charakter der Phasen wieder.

Die Befunde aus Abb. 16, 17 und 18 zeigen, dass der hydrophobe bzw. polare Charakter einer stationären Phase offensichtlich durch die in **Tabelle 2** gezeigten Merkmale (mit)bestimmt wird.

2. Es hat sich abermals gezeigt, dass die Grundvoraussetzung für eine gute Peakform eine schnelle Kinetik und damit zusammenhängend eine gute Zugänglichkeit der Analytmoleküle zu den funktionellen Gruppen ist. So ergibt sich ein flacher C-Term bei Van-Deemter-Kurven nicht nur (wie zu erwarten) bei RP-Phasen mit homogener Oberfläche wie z. B. SunFire,

Pursuit und Gemini sondern auch bei XBridge Shield, Atlantis d, Polaris A und Primesep C100/A. Letztere verfügen zwar schon über polare Gruppierungen, die Kinetik bei der Wechselwirkung mit Analytmolekülen ist dennoch schnell. Eine langsame Kinetik wird an bekannten polaren Phasen, aber auch an Phasen festgestellt, die als stark hydrophob zu bezeichnen sind wie z. B. Discovery C18 und YMC Pro RS. Dies sind Phasen, die offensichtlich zwar nur über ein ‚paar‘ Silanolgruppen verfügen, jene allerdings im Falle von ionischen Wechselwirkungen sich als äußerst störend bemerkbar machen.

3. Spielen polare/ionische Wechselwirkungen keine oder nur eine untergeordnete Rolle, ergibt sich an Phasen mit gleicher Matrix und unterschiedlichen funktionellen Gruppen kaum ein Unterschied in der Kinetik und damit in der Peakform, z. B.

Acclaim PA C18/C16,
Discovery C18/Amide C16,
Ascentis C18/RP Amid C16,
Polaris Ether/A.

4. Das Minimum der Van-Deemter-Kurve ist in ACN-haltigen Eluenten recht flach, die Konsequenz lautet: In solchen Eluenten ist der Fluß unwichtig, man kann ohne nennenswerte Effizienzverluste bei höheren Flüssen arbeiten.

Eignung von RP-Materialien für bestimmte Analyttypen

Hydrophobe RP-Phasen

Hydrophobe RP-Phasen eignen sich für solche Trennprobleme, bei denen zwischen den Analyten und der stationären Phase hydrophobe Wechselwirkungen dominieren. Die zu trennenden, eher neutralen Komponenten unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße und/oder in ihrem hydrophoben / polaren Charakter, bedingt durch eine (mehrere) Gruppe(n) wie CH₃ / C₂H₅, O, NO₂, NH₂ usw. oder durch Stellungsisomerie. Beispielhaft wären zu nennen:

Ester, Ketone, einkernige, ‚kleine‘ Aromaten (Trennung Ethylbenzol / Toluol, ‚Methylengruppenselektivität‘, [Abbildung 19](#) und [Abbildung 20](#)), Steroide.

Des weiteren kann es sich um Komponenten handeln, die durch einen geeigneten pH-Wert im Eluenten aktuell in neutraler Form vorliegen, wie z. B. wasserlösliche Vitamine (Beispielchromatogramme wasserlösliche Vitamine), schwache organische Säuren bzw. Basen (Trennung organischer Basen, [Abbildung 21](#), und Metaboliten, [Abbildung 22](#), Beispielchromatogramme Antidepressiva und Beispielchromatogramme Metaboliten von Antidepressiva). Auch hier weisen die Komponenten einen ausreichend ausgeprägten organischen Charakter auf und somit sind hydrophobe Wechselwirkungen möglich.

Polare RP-Phasen

Polare RP-Phasen werden benötigt, wenn polare/ionische Wechselwirkungen mit den Analyten möglich sind, z. B. Ionenaustausch, Wasserstoffbrückenbindung, Komplexbildung, Dipol-Dipol- sowie $\pi \dots \pi$ -

Wechselwirkung. Solche Wechselwirkungen sind dann auch nötig, denn die Differenzierung und damit die Trennung erfolgt (muß erfolgen) über den ionischen Charakter. Als Beispiele wären zu nennen:

1. ‚Große‘, hydrophobe Aromaten (Trennung Chrysen/Perylen, aromatische Selektivität, [Abbildung 23](#), [Abbildung 24](#) und [Abbildung 25](#)).
2. Planare/nicht planare Moleküle (Trennung Triphenylen/o-Terphenyl, sterische Selektivität, [Abbildung 26](#), [Abbildung 27](#) und [Abbildung 28](#), Beispielchromatogramme aromatische und sterische Selektivität).
3. Stark aromatische Säuren (Trennung aromatischer Säuren, [Abbildung 29](#), Beispielchromatogramme aromatische Säuren).
4. Kleine, stark polare Moleküle wie polare Verunreinigungen, Metabolite, Salze.

Beispielchromatogramme

Beispielchromatogramme wasserlösliche Vitamine

Es wurde eine Mischung aus Niacinamid, Pyridoxin, Ascorbinsäure, Nicotinsäure und Thiamin in Acetonitril/Phosphatpuffer bei pH = 2,7 getrennt. An polaren Säulen wie Zorbax SB C8 ([Chromatogramm 7](#)) und Atlantis d C18 ([Chromatogramm 8](#)) werden die Peaks auseinander gezogen, es ergeben sich jedoch nur 4 Peaks. An einem hydrophoben Material, wie dem XBridge C18 ([Chromatogramm 9](#)) können die fünf Peaks zwar getrennt werden – aber eher dürftig. Die beste Trennung wird an mittelpolaren Phasen wie der Gemini ([Chromatogramm 10](#)) beobachtet. Um die Selektivität der unterschiedlichen Phasen genauer zu überprüfen, wurden die Trennungen erneut in Wasser/Methanol 90/10 durchgeführt. Auch hier zeigt sich, dass an polaren Phasen die Peaks weiter ‚auseinander gezogen‘ werden, die Peakform jedoch lässt – bei einer hervorragenden Selektivität – zu wünschen übrig, siehe [Chromatogramm 11](#) pH LIC.

In [Abbildung 21](#) sind die Trennfaktoren von Antidepressiva, in [Abbildung 22](#) von Metaboliten von Antidepressiva im alkalischen Acetonitril / Phosphatpuffer, pH = 11, an einigen alkali-stabilen RP-Phasen zu sehen. Auch hier erweisen sich in beiden Fällen hydrophobe RP-Phasen vorteilhafter gegenüber polaren RP-Materialien: Das mit einer Polymerschicht versehene, sehr hydrophobe Pathfinder PS-, das hydrophobe XBridge C18- und das Gemini-Material mit mittlerer Hydrophobie zeigen gegenüber den polareren EPG(Eingebaute Polare Gruppe)-Materialien XBridge Shield C 18 und XTerra die bessere Selektivität.

Beispielchromatogramme Antidepressiva (organische Basen)

Im Alkalischen liegen die Analyte undissoziiert vor und die Trennung erfolgt vorwiegend über deren hydrophoben Charakter, vergleiche dazu die Trennung an

- XTerra: [Chromatogramm 12](#),
- XBridgeShield: [Chromatogramm 13](#),
- XBridge C18: [Chromatogramm 14](#).

An den zwei erstgenannten polaren Materialien wird entweder ‚vorne‘ oder ‚hinten‘ schlecht getrennt. Die beste Selektivität wird am hydrophoben XBridge C18 festgestellt.

Beispielchromatogramme Metaboliten von Antidepressiva

Wie bereits in früheren Arbeiten berichtet, geraten bei Verwendung von Puffern die individuellen Unterschiede der stationären Phasen bzgl. Selektivität in den Hintergrund. So sehen die Chromatogramme an XBridgeShield, XTerra und sogar an Gemini – bei leicht besserer Selektivität – sowohl im Alkalischen:

Chromatogramm 15,
Chromatogramm 16,
Chromatogramm 17,

als auch im Sauren recht ähnlich aus:

Chromatogramm 18,
Chromatogramm 19,
Chromatogramm 20.

Sogar an zwei sehr unterschiedlichen RP-Phasen wie der SunFire und Primesep C mit einer völlig unterschiedlichen ‚Chemie‘ der Oberfläche ergeben sich ähnliche Chromatogramme:

Abbildung 7,

Selektivitätsunterschiede ergeben sich vor allem im Falle von sehr polaren Analyten, siehe dazu einerseits die Elution der polaren Verunreinigung an SunFire bei der Totzeit und andererseits ihre Retardierung an Primesep C (Peak bei 1,87 min).

Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25: Eine gute aromatische Selektivität zeigen RP-Materialien, die in der Lage sind, polare Wechselwirkungen einzugehen.

In Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28 sind die Trennfaktoren Ethylbenzol/Toluol (hydrophobe Selektivität) und Triphenylen/o-Terphenyl (sterische Selektivität) abgebildet. Eine gute sterische Selektivität weisen jene RP-Phasen auf, die - wie im Falle von großen hydrophoben Aromaten - zu polaren Wechselwirkungen befähigt sind, z. B:

- XBridge Shield, Symmetry Shield, Discovery Amide C16, Primesep C, HyPurity Advanced usw., also Phasen, die über eine eigebaute polare bzw. ionische Gruppe verfügen.
- Bifunktionelle stationäre Phasen, wobei die - neben der Alkylkette - zweite funktionelle Gruppe eine ‚lediglich‘ polare (Sphinx) oder eine ‚richtig‘ polare (UP5MM1) sein kann.
- Auch Phasen mit Restsilanolgruppen (LiChrosorb), ‚Kombiphasen‘, also solche mit einem sterischen plus chemischen Schutz (Zorbax Bonus RP) oder solche mit polarer EPG, polarer Endgruppe plus polarer Gruppe direkt an der Oberfläche (Synergi POLAR RP), zeigen hier eine ebenfalls gute Selektivität.

Beispielchromatogramme aromatische und sterische Selektivität

Es wurde eine Probe bestehend aus Uracil, Methylhydroxybenzoat, Propylhydroxybenzoat, Ethylbenzol, Toluol, Triphenylen und o-Terphenyl bei 80/20 Methanol/Wasser an allen Säulen getrennt. Die beste sterische Selektivität (zwei letzte Peaks) zeigen polare stationäre Phasen. Dabei kann jedoch sein, dass sehr gute sterische Selektivität entweder – wie im Falle von Discovery HS F5 (Chromatogramm 1) – mit mangelnder Selektivität für die vorderen Peaks und/oder – wie im Falle von UP5MM1

(Chromatogramm 2) – mit einer sehr langsamen Kinetik und demnach einem starken Tailing ‚bezahlt‘ wird. Eine gute Alternative (gute Selektivität) sowohl für kleine, einkernige Aromaten als auch für sterisch anspruchsvolle Strukturen stellen Phasen mit einem hydrophoben und einem polaren Charakter dar, wie Accentis Amide C16 (Chromatogramm 3), und SymmetryShield (Chromatogramm 4). Der ‚Buckel‘ in Chromatogramm 4 bei 13,08 min ist ein Memory-Effekt aus einer früheren Injektion.

Beispielchromatogramme aromatische Säuren

In Chromatogramm 5 und Chromatogramm 6 werden die Trennung von 3-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzoesäure (eher schwache Säuren) sowie Phthalsäure und Terephthalsäure (eher starke Säuren) dargestellt. Am hydrophoben Ascentis C18 (Chromatogramm 5 links) werden die schwachen Säuren - zwei letzte Peaks - gut, am polaren Ascentis RP Amid (Chromatogramm 5 rechts) die starken Säuren gut getrennt (Peaks bei 2,87 und 5,03 min). Die schwachen Säuren werden lediglich angetrennt (Peak bei 4,39 min). An UP5MM1 schließlich (Chromatogramm 6) werden alle Säuren gut abgetrennt. UP5MM1 stellt also eine Phase dar, die eine Zwischenstellung zwischen den zwei ‚Spezialisten‘ einnimmt: Ausreichende Selektivität sowohl für starke als auch für schwache Säuren.

Abschlussbemerkungen zur Säulenauswahl

Aus den hiesigen sowie früheren Messungen ergeben sich folgende, vereinfacht formulierte Empfehlungen bezüglich Säulenauswahl bei der Trennung einer unbekannt Probe:

Bei der Säulenauswahl sollten im Falle von unbekannt Komponenten alle drei Aspekte, welche die Selektivität beeinflussen können, berücksichtigt werden: hydrophobe Wechselwirkungen, polare Wechselwirkungen, sterische Aspekte (unterschiedlicher Porendurchmesser).

Wenn die Selektivität den individuellen Anforderungen genügt, sollten für eine Routinemethode stets hydrophobe, gut abgedeckte RP-Phasen bevorzugt werden: Die Chargenreproduzierbarkeit ist in der Regel besser als bei polaren RP-Materialien und es ergeben sich weniger Probleme im Routinebetrieb bezüglich Reproduzierbarkeit von Retentionszeit, Peakform und Peakfläche.

Je ähnlicher die zu trennenden Moleküle im Sinne der ‚Chemie‘ bzw. je größer die Unterschiede in ihrer räumlichen Anordnung sind, umso notwendiger wird der Einsatz von polaren RP-Phasen. Vereinfacht ausgedrückt: Ermöglichte bei ‚schwierigen‘ Trennungen polare/ionische Wechselwirkungen!

Bei der Neutralisation von ionischen Spezies und der Verwendung von Puffern wird eine Art ‚Gleichmacherei‘ der Säulen bezüglich ihrer Selektivität beobachtet, ihre individuellen Unterschiede geraten in den Hintergrund – selbstverständlich gibt es schon merkliche Unterschiede bezüglich der Peakform. Anders formuliert: Herrschen nahezu ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen, verhalten sich die stationären Phasen bezüglich Selektivität recht ähnlich, die Konsequenz lautet: Die Säulenauswahl ist zweitrangig, die Trennungsoptimierung erfolgt hauptsächlich über die Eluentenzusammensetzung.

Je größer die Hydrophobie-Unterschiede der Analyte (auch nach der

Neutralisation mittels eines geeigneten pH-Wertes), umso größer kommen die Unterschiede der stationären Phasen zum Tragen. Folgende Regel wird immer wieder bestätigt: Sollte die Selektivität es erlauben, empfiehlt sich, Trennungen im Sauren durchzuführen: Bei besserer Peakform ergibt sich eine längere Lebensdauer der Säulen im Vergleich zum neutralen oder zum alkalischen Bereich.

Sind viele, recht unterschiedliche Komponenten zu trennen, so kämen möglicherweise mittelpolare RP-Phasen in Frage. Eine eventuell notwendige Verbesserung der Selektivität wäre über den Eluenten zu erreichen: pH-Wert-Änderung (hier sollte man auch an unterschiedliche Säuren/Basen zur Einstellung des pH-Wertes denken!), Änderung des organischen Anteils im Eluenten, aber auch des organischen Lösungsmittels selbst (d. h. % B aber auch Acetonitril gegen Methanol ersetzen), Verwendung eines Modifiers, z. B. THF.

Trennung von Säuren und Basen, oder: Prinzip ‚Ähnliches mit Ähnlichem‘

Stark vereinfachte Regeln:

- Versuchen Sie es zunächst mit hydrophoben Phasen – also Trennung im Wesentlichen über den unterschiedlichen hydrophoben Charakter. Bei Bedarf – d. h. um ionisch vorliegende Spezies zu neutralisieren – verwenden Sie bitte unterschiedliche pH-Werte, zunächst von ca. 2 bis 7 in 0,5 pH-Einheiten-Schritten. Wesentlich elegantere bzw. effektivere Variante: Sind die pK_S-Werte bekannt oder können sie über die Molekülstruktur mit Hilfe von entsprechenden Programmen (z. B. ACD-Software, acdlabs.com) ermittelt werden, sollten Sie anschließend drei lineare Gradienten fahren: Einmal bei dem pK_S-Wert der Hauptkomponente/kritischem Peak sowie +/-0,5 pH-Einheiten um diesen pH-Wert. Im Falle von stark sauren/basischen Species wären jene bei extremen pH-Werten zu neutralisieren, hier sollten Säure- bzw. Alkali-stabile RP-Phasen zur Anwendung kommen. Letzte/alternative Möglichkeit sind Ionenpaarreagenzien.
- Je polarer die Analyte, umso polarer sollte die stationäre Phase sein (zusätzliche polare Wechselwirkungen notwendig).
- Liegen die Analyte ionisch vor bzw. müssen sie so vorliegen, um jene über deren unterschiedlichen ionischen Charakter trennen zu können, so werden dissoziationsfähige funktionelle Gruppen an der stationären Phase benötigt. Deren Dissoziationsgrad – wie natürlich auch von den Analyten – kann über den pH-Wert des Eluenten beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall hätten wir wie folgt: Ausreichende Retardierung durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem organischen Rest des Moleküls und den Alkylketten an der stationären Phase (welche auch immer), Differenzierung und damit Trennung über Ionenaustausch-Wechselwirkungen.
- Hat man mit ausgespochenen Ionen zu tun, die auch bei extremen pH-Werten, nahezu 100% igen Eluenten und an sehr polaren stationären Phasen nicht retardiert werden können, so müsste man sich der Ionenaustausch-Chromatographie zuwenden.