

Vergleich und Auswahl von modernen HPLC-RP-Säulen

Antoni Kromidas (1), Hans-Joachim Kuss (2), Stavros Kromidas (3)

In jüngster Zeit sind von bekannten Säulenherstellern eine Vielzahl neuer RP-Säulen eingeführt worden. Bei der mittlerweile derart großen Zahl an RP-Materialien auf dem Markt, wird es für den Anwender zunehmend schwierig, aus diesem Pool die für ihn „richtige“ Säule auszusuchen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Bezeichnungen sich recht häufig ähneln – oder umgekehrt die Säulenhersteller werbewirksame Kunstnamen verwenden. Wir haben mit Hilfe systematischer Messungen eine Reihe von in letzter Zeit neu vorgestellten Säulen getestet und miteinander verglichen. Nachfolgend werden die Ergebnisse in verdichteter Form vorgestellt.

An anderer Stelle werden unsere Versuchsergebnisse ausführlich beschrieben (1, 2). In vorliegendem Artikel werden die Säulen mit Hilfe zweier Visualisierungstools miteinander verglichen und die Befunde kommentiert.

Ähnlichkeit von RP-Säulen

Vorbemerkung

In den nachfolgenden Ausführungen wird als Kriterium für die Ähnlichkeit von RP-Materialien ausschließlich die Selektivität (Trennfaktor, α) 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 dem Retentionsfaktor k oder der Bodenzahl N wird hier verzichtet, weil der k -Wert aus Anwendersicht keine so hohe Priorität besitzt und die Bodenzahl von vielen Faktoren abhängt: Nur eine sehr aufwendige und nicht unumstrittene Normierung erlaubt, einigermaßen brauchbare Aussagen bzgl. vergleichbarer Bodenzahlen zu gewinnen. Es existieren mehrere Möglichkeiten, die Ähnlichkeiten von RP-Säulen zu visualisieren. Zwei aussagekräftige Tools sind die Selektivitätskarten und die Selektivitätshexagone. Nachfolgend werden sie vorgestellt und deren Anwendung erläutert.

Selektivitätskarten

In Abb. 1 sind 23 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

1. Finden einer „besseren“ Säule bei Optimierungsversuchen

- Man hat im Zuge einer Methodenentwicklung z. B. Pursuit C18 (Gruppe A) mit mäßigem Erfolg getestet. Es ist unwahrscheinlich, dass eine Säule, die ähnliche Eigenschaften aufweist, wie z.B. Discovery C18 oder SunFire, eine wesentlich bessere Trennung ermöglicht. Mit einer Säule aus der Gruppe B (z.B. Synergi FUSION-RP) oder gar Gruppe C (z.B. XBridge Shield) hätte man vermutlich die größeren Chancen, da eine andere Selektivität zu erwarten ist.

2. Finden einer alternativen Säule

- Polaris C18-A (Gruppe), eine in einem Labor verwendete Säule, ist z. Z. überhaupt nicht lieferbar oder nicht in der gewünschten Säulendimension. Eine alternative Säule, mit der man wahrscheinlich eine ähnliche Trennung erzielen könnte, wäre z.B. Atlantis dC18.

3. Finden von in Frage kommenden Säulen bei einer Methodenentwicklung

- Es muss eine Methode für eine unbekannte Probe entwickelt werden. Aus ökonomischen Gründen wird ein Säulenschaltventil verwendet. Sinnvoll wäre es nun, wenn das verwendete Säulenschaltventil für z. B. sechs Säulen wie folgt bestückt werden würde: Man verwende je zwei Säulen aus den drei Bereichen (hydrophob, mittelpolar, stark polar). Die Wahrscheinlichkeit, dass dann über Nacht an irgend einer der sechs verschiedenen Säulen ein brauchbares Chromatogramm für die weitere Feinoptimierung erhalten werden kann, ist recht groß.

4. Finden einer „geeigneten“ Säule für einen orthogonalen Test

- Orthogonale Tests (gleiche Säule und anderer Eluent oder gleicher Eluent und andere Säule) stellen ein hervorragendes Tool dar, 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, s. dazu ein Beispiel:

Bei der Trennung von Metaboliten von tricyclischen Antidepressiva eluiert eine polare Verunreinigung an allen klassischen, hydrophoben Säulen aus der Gruppe A (Abb. 1) inert, so auch an SunFire, linkes Chromatogramm, Abb. 2. Erst die Verwendung von Primesep C 100, einer C18-Säule mit einem zusätzlich eingebauten komplexfähigen Liganden (s. Gruppe C, Abb. 1), ermöglicht das Retardieren und damit die Quantifizierung dieser polaren Verunreinigung.

Abb. 1:

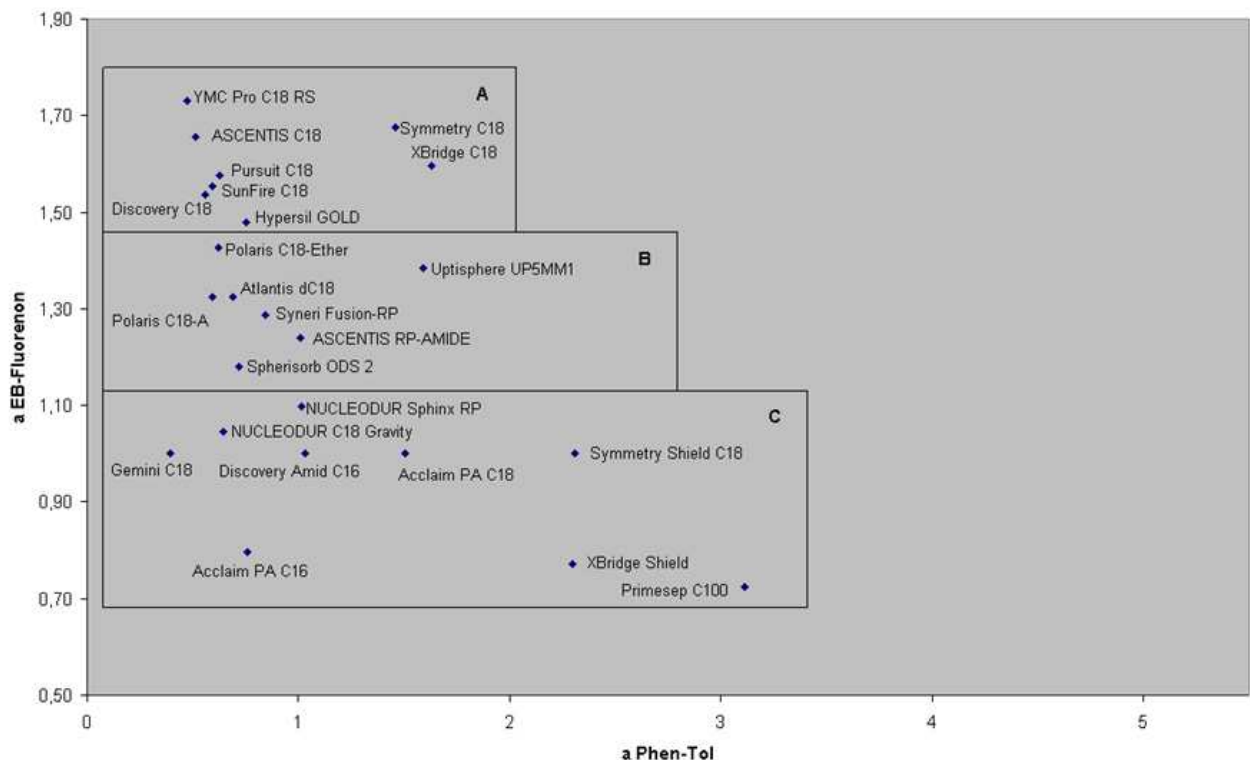
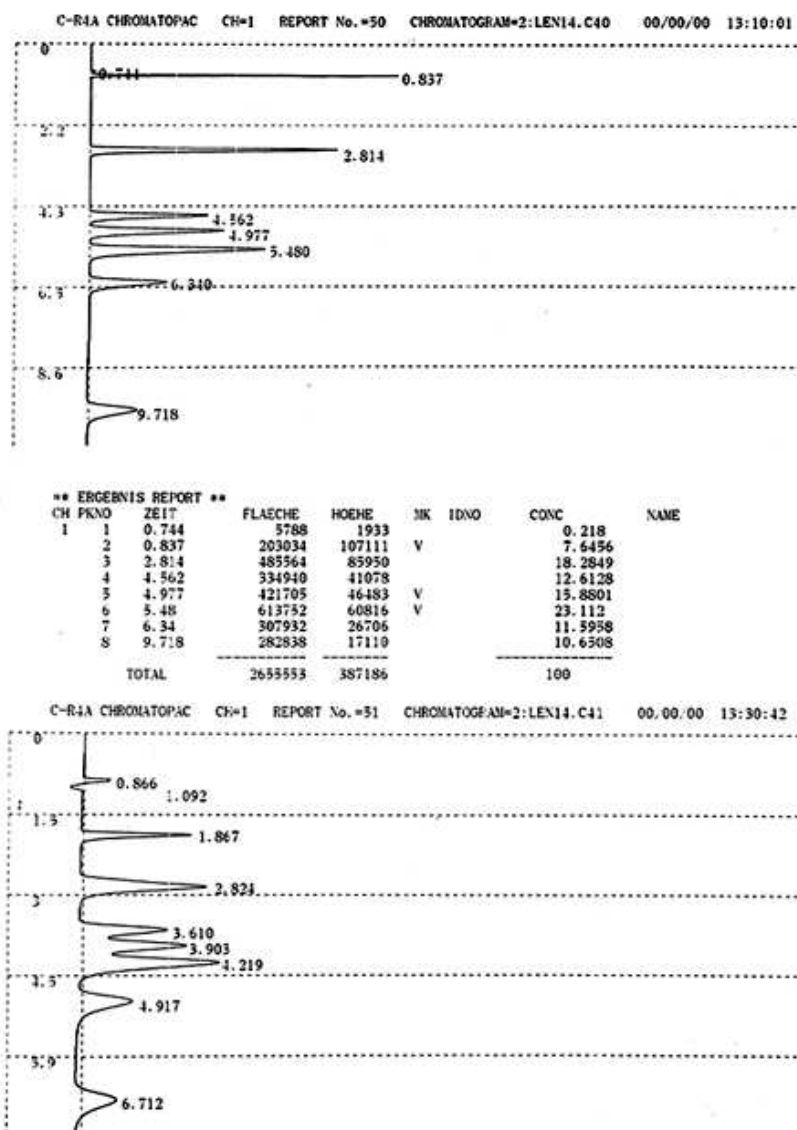


Abb. 2:



Selektivitätshexagone

Bei den Selektivitätshexagonen entsprechen die sechs Ecken normierten Trennfaktoren (α -Werten), die bei der Trennung bestimmter Analytpaare an einer Säule gemessen werden.

Man betrachte in Abb. 3 eine derartige Darstellung. Es sind Selektivitätshexagone, die das Selektivitätsverhalten von neueren Säulen und als Vergleich dazu auch von Spherisorb ODS 2 - einem älteren Material - für unterschiedliche aromatische Verbindungen wiedergegeben, abgebildet.

Es wurden folgende sechs Analytpaare 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 Strukturen, Triphenylen/o-Terphenyl)

„ α EB/Fl“: hydrophobe Selektivität (Trennung über den hydrophoben Charakter, CH₃ vs. C=O-Gruppe, Ethylbenzol/Fluorenon)

„ α Normetanephrin/Epinephrin“: hydrophobe Selektivität (Trennung von Amininen über den hydrophoben Charakter)

„ α Terepht./Phtal“: Selektivität für starke aromatische Säuren, Terephthal-/Phthalsäure

„ α Nicotinsäure/Ascorbinsäure“: Selektivität für eher schwache aromatische Säuren
Beispiele für die Anwendung eines Selektivitätshexagons, s. dazu Abb. 3a, die einen vergrößerten Ausschnitt der Abb. 3 darstellt.

1. Ähnliche Säulen für eine bestimmte Substanzklasse

- Auch rein optisch ist leicht zu erkennen, dass z. B. XBridge C18 und YMC Pro C18 RS 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 vergleichbar, es ergeben sich gleichaussehende Hexagone.

2. Finden der „selektivsten“ Säule für einen bestimmten Analyttyp

- Sie suchen eine geeignete Säule für die Trennung einer konkreten Substanzklasse, z. B.: „Welche Säule ist die „beste“ für die Trennung von starken, aromatischen Säuren?“ Man kann nun den Hexagonen leicht entnehmen, dass an Primesep C 100 sich der größte Trennfaktor α bei der Trennung der zwei starken Säuren Terephthal-/Phthalsäure („ α Tere/Phtal“) ergibt, jene Säule wäre beispielsweise eine erste Wahl. Eine gute Selektivität dafür zeigen auch Ascentis RP-Amide oder XTerra. Schwach aromatische Säuren dagegen wie Nicotinsäure/Ascorbinsäure werden an hydrophoben RP-Phasen wie z. B. XBridge C18, NUCLEODUR C18 Gravity, YMC Pro C18 RS oder Synergi Hydro-RP gut getrennt.

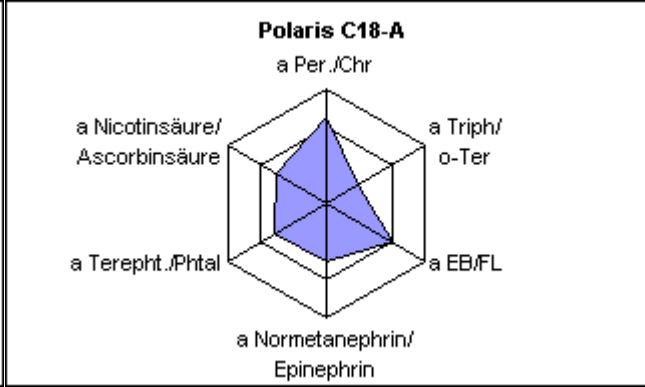
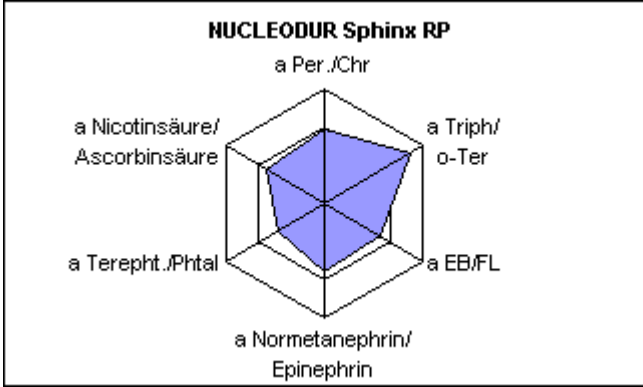
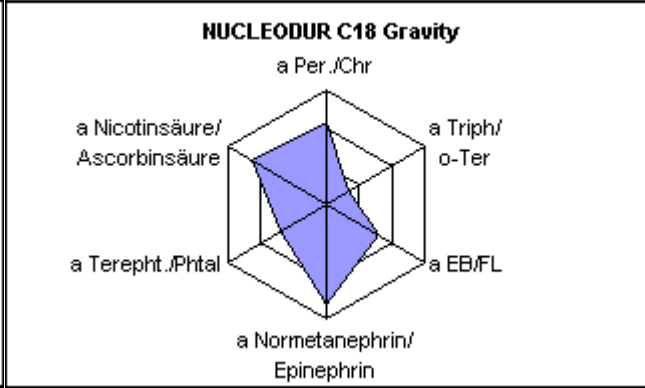
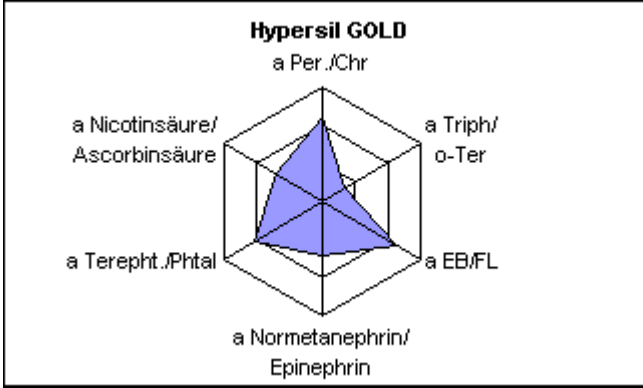
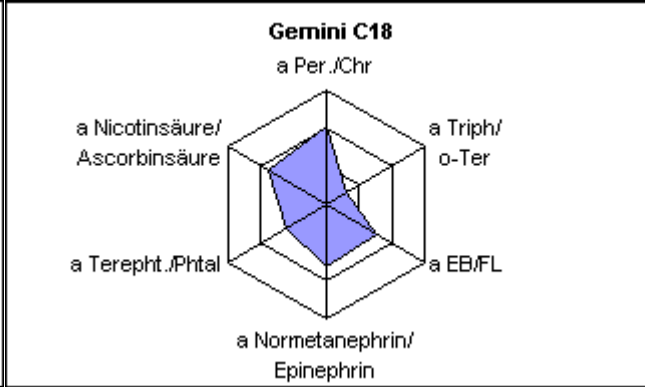
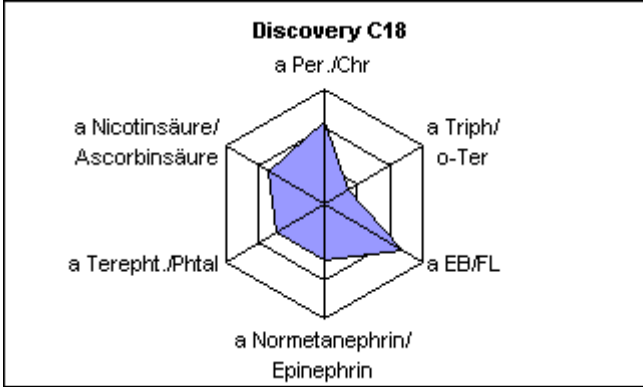
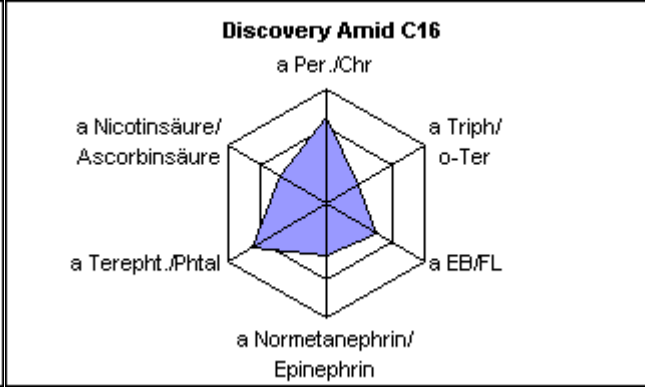
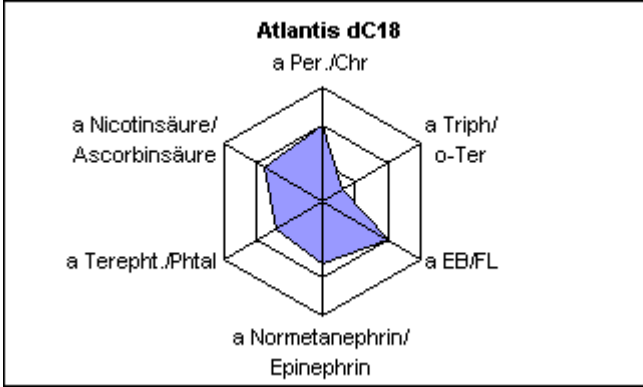
3. Welche Säule eignet sich als „Universal“-Säule für die Trennung von ...?

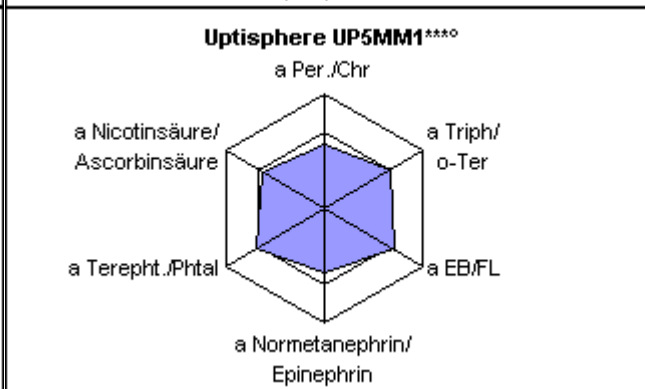
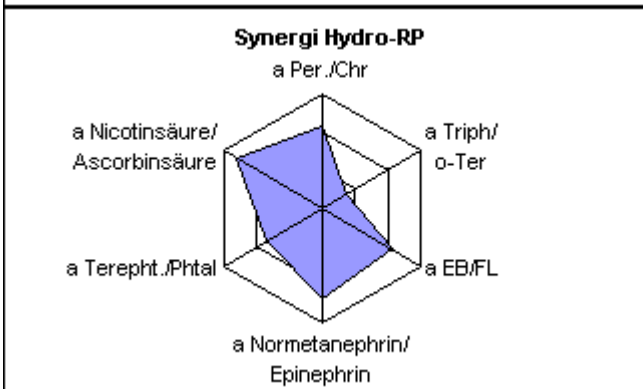
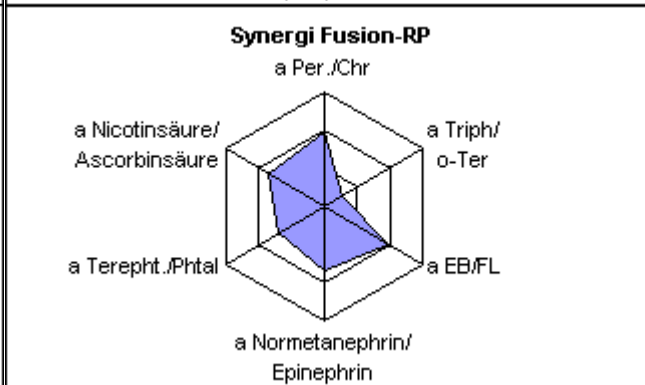
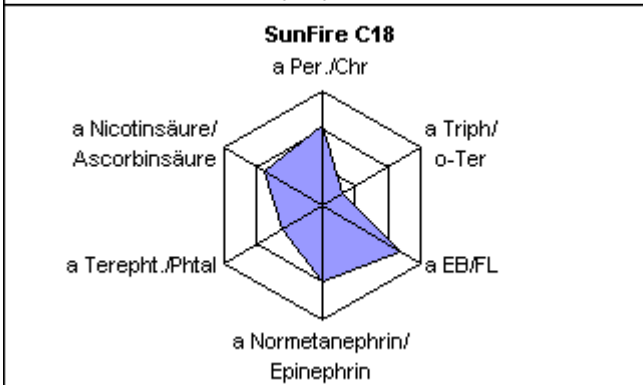
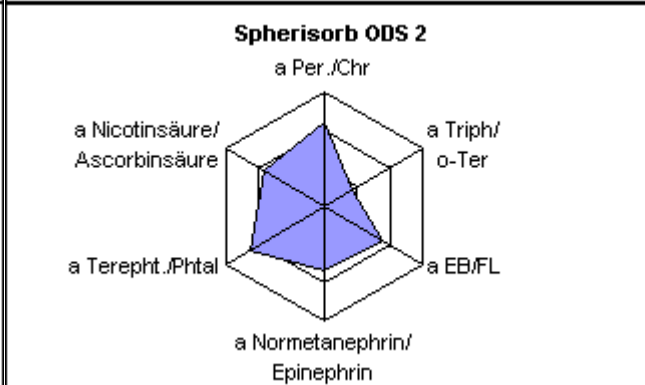
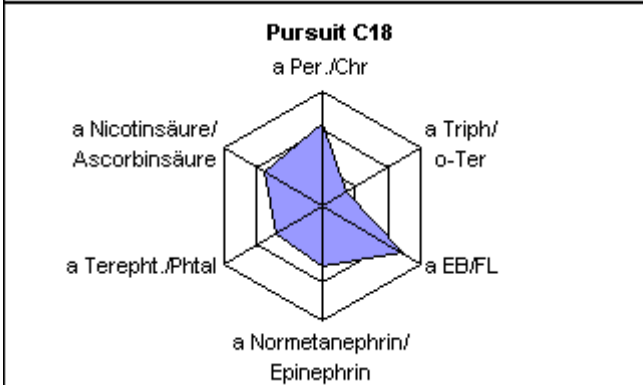
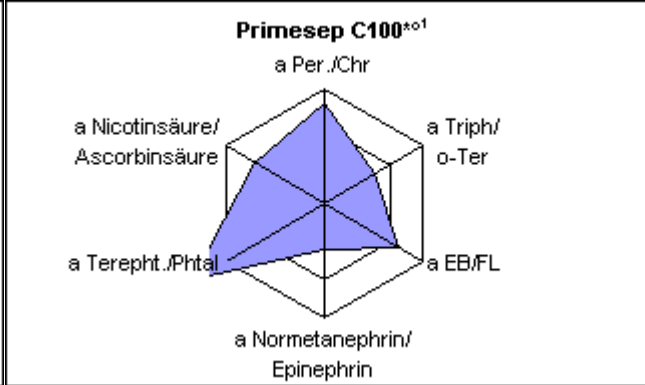
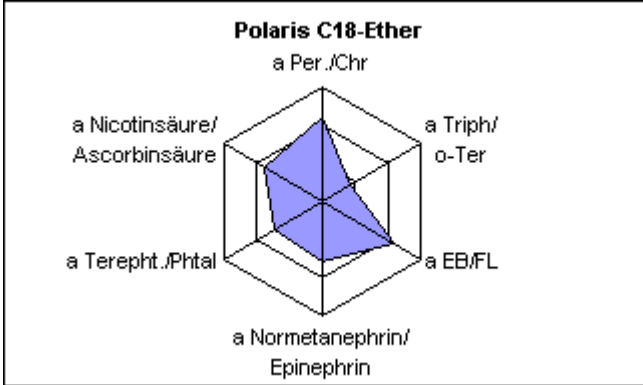
- Sie möchten Proben mit recht unterschiedlichen aromatischen Komponenten analysieren. Sie suchen also nach einer „Universalsäule“ für Aromaten, d.h. eine Säule, die in der Lage ist, möglichst unterschiedliche aromatische Verbindungen selektiv zu trennen. Je symmetrischer nun ein Hexagon ist, umso universell einsetzbar wäre die entsprechende Säule für diese Fragestellung. Im vorliegenden Beispiel wäre Uptispher UP5MM1 eine dafür geeignete Säule. Ist die sterische Selektivität dagegen von besonderer Relevanz (Trennung von planaren/nicht planaren Molekülen, „ α Triph/O-Ter“), so wäre NUCLEODUR Sphinx RP eine ebenso „universell“ einzusetzende Säule. Ist andererseits eine gute Selektivität für stark aromatischen Säuren unwichtig, kämen alle hydrophobe Phasen in Frage, s. Ausführungen weiter oben.

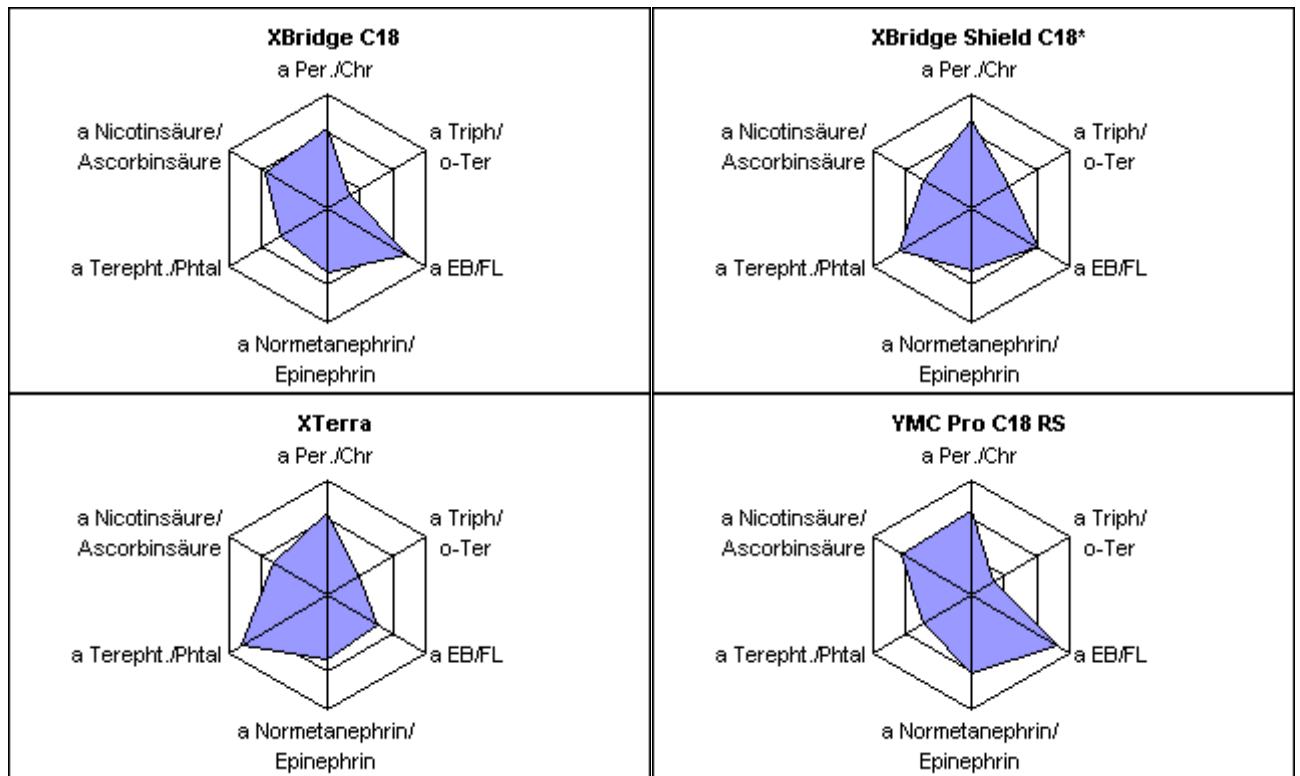
Der optische Vergleich von Selektivitätshexagonen schließlich, die quasi eine Art Pictogramme für Säulen darstellen, ermöglicht ferner eine schnelle, gezielte Auswahl von geeigneten Säulen für orthogonale Tests (unterschiedliche Eigenschaften von Säulen und damit unterschiedliche Mechanismen möglich).

Abb. 3 kann man natürlich weiteren Informationen entnehmen, es sei hier beispielhaft noch folgendes festgehalten:

- Von den drei untersuchten „C16-Phasen“ sind Ascentis RP-Amide und Discovery Amide C16 polarer als Acclaim PA C16 (s. „ α Terepht./Phtal.), noch 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.







* a FI/EB

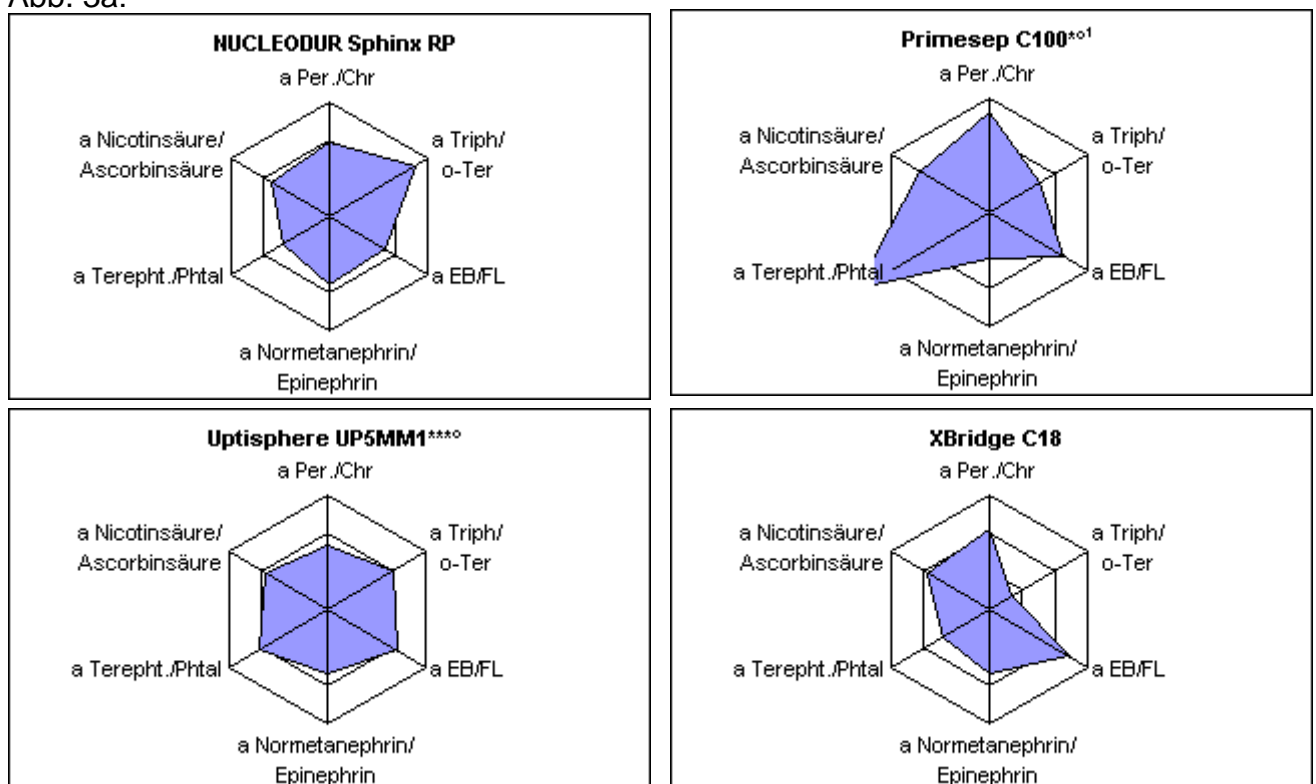
** a Epi/Normet

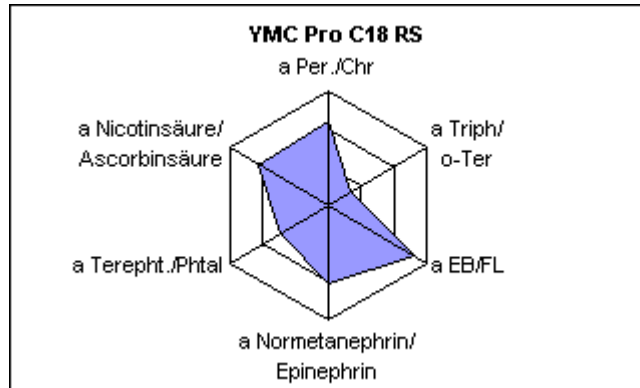
*** a Phtal/Tere

◦ a Asc./Nicotins

¹ a-Wert Terepht./Phtal nicht genau ermittelt, aber sehr groß

Abb. 3a:





*** a FI/EB**

**** a Epi/Normet**

***** a Phtal/Tere**

◦ a Asc./Nicotins

¹ **a-Wert Terepht./Phtal nicht genau ermittelt, aber sehr groß**

Sehr detaillierte Informationen möglich

Die nachfolgenden Ausführungen sind recht detailliert und für stark interessierte Leser geeignet.

Wenn sachkundige Anwender sich etwas intensiver mit dieser Darstellungsart beschäftigen möchten und die in den Hexagonen enthaltenen Informationen mit Befunden aus anderen Experimenten in Bezug setzen, könnten sie recht konkrete Rückschlüsse auf den Charakter und die Anwendbarkeit von Säulen ziehen. Das sei nachfolgend kurz demonstriert, wobei betont werden muß, dass selbstverständlich eine wesentlich umfangreichere Diskussion möglich ist. Eine solche allerdings würde den hier beabsichtigten Umfang bei weitem sprengen.

Während in Abb. 3 die Säulen alphabetisch sortiert sind, werden sie in Abb. 4a und 4b ihrer Ähnlichkeit entsprechend sortiert.

Man betrachte zunächst Abb. 4a, dort sind RP-Phasen mit polarem Charakter aufgeführt.

- Der komplexfähige Ligand bei Primesep C100 bzw. die polare Gruppe bei Ascentis RP Amide (beide sich an der Alkylkette befindend) verleihen den zwei Phasen eine sehr gute Selektivität für die Trennung von starken aromatischen Säuren (s. 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 als in der XTerra-Matrix.
- Zu Vergleichszwecken wurde auch das ältere, endcappede 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 der hydrophoben Materialien aus Abb. 4b ähnlich aus.

- Hypersil GOLD verfügt sowohl über einen hydrophoben - s. die gute Selektivität für α Per/Chr – als auch über einen polaren Charakter, s. Selektivität für Terepht./Phtal

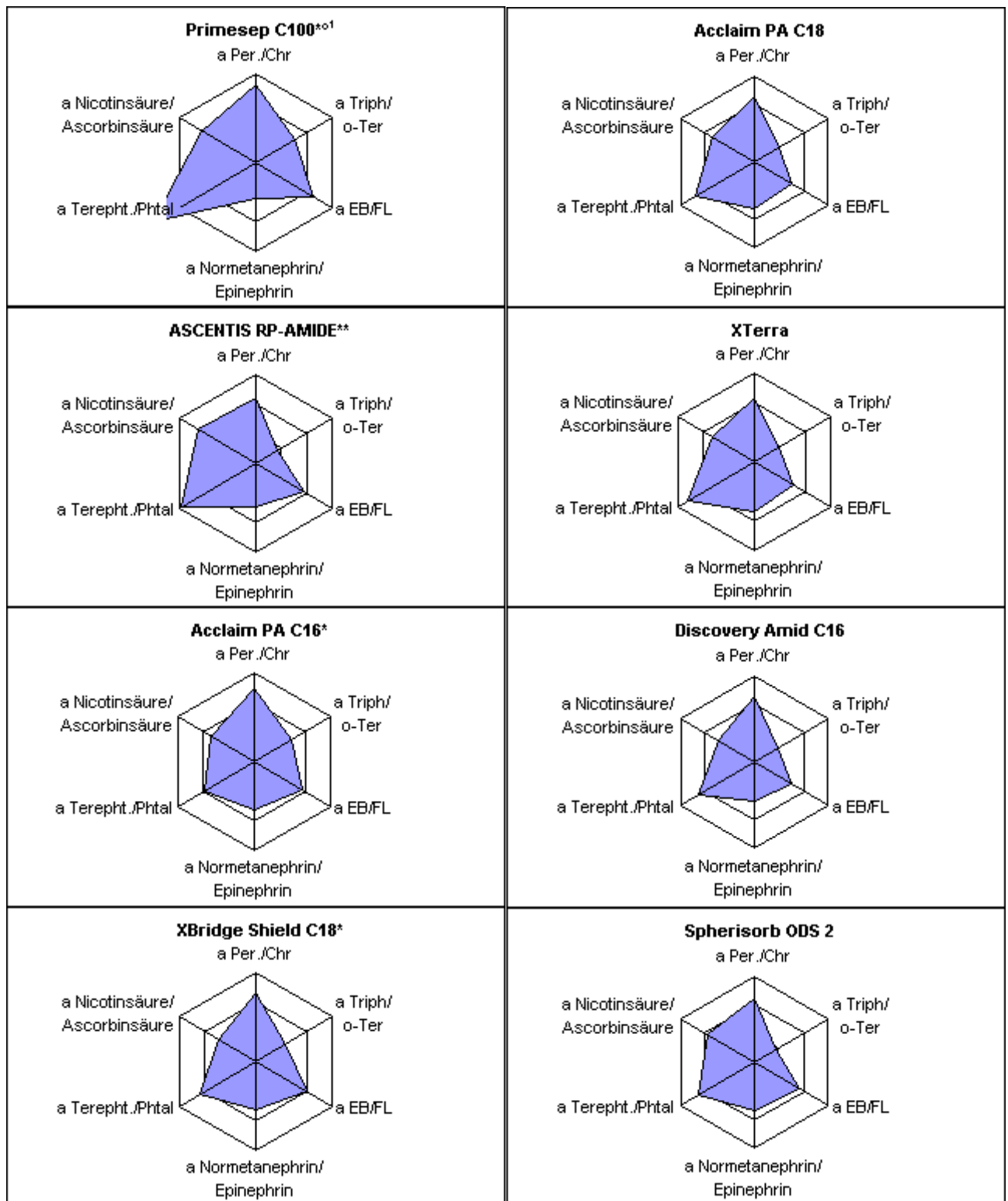
In Abb. 4b befinden sich Hexagone von „hydrophoben“ RP-Phasen, die Bandbreite ist jedoch merklich:

- Atlantis dC18, YMC Pro C18 RS und Polaris C18-A sind mehr oder weniger hydrophobe Materialien. Atlantis dC18 weist aufgrund der geringen Belegung jedoch einen polarerer Charakter als z. B. YMC Pro C18 RS auf. Polaris C18-A ist wegen der eingebauten polaren Gruppe am Alkylrest polarer als die zwei Erstgenannten. 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.

In Abb. 5 werden abschließend nocheinmal zum Vergleich sechs Hexagone dargestellt, die unterschiedliche „RP-Typen“ vertreten. In Klammer wird ein typisches Selektivitätsmerkmal des entsprechenden „RP-Typus“ erwähnt:

- Ascentis RP-Amide: Stark polare eingebaute Gruppe (ionische Wechselwirkungen möglich, gute Selektivität für (sehr) polare aber auch für ionisch vorliegende Analyte)
- XBridge Shield C18: Eingebaute polare Carbamat-Gruppe (recht gute Selektivität für polare und für sterisch anspruchsvolle Analyte)
- XBridge 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 – s. als Vergleich α Terepht./Phtal bei Ascentis RP-Amide, α EB/Fl bei XBridge Shield C18 oder α Triph/o-Ter bei Nucleodur Sphinx RP – aber ein interessanter „Universalcharakter“)

Abb. 4a:



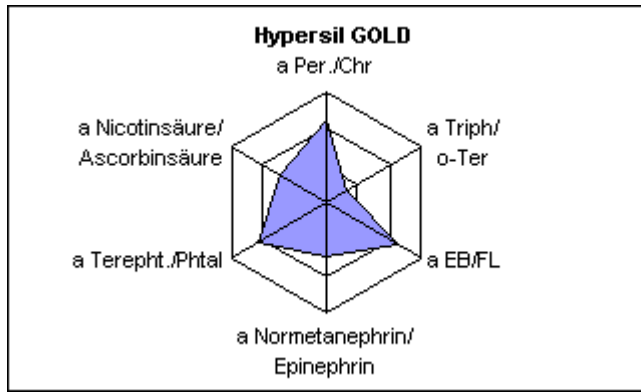
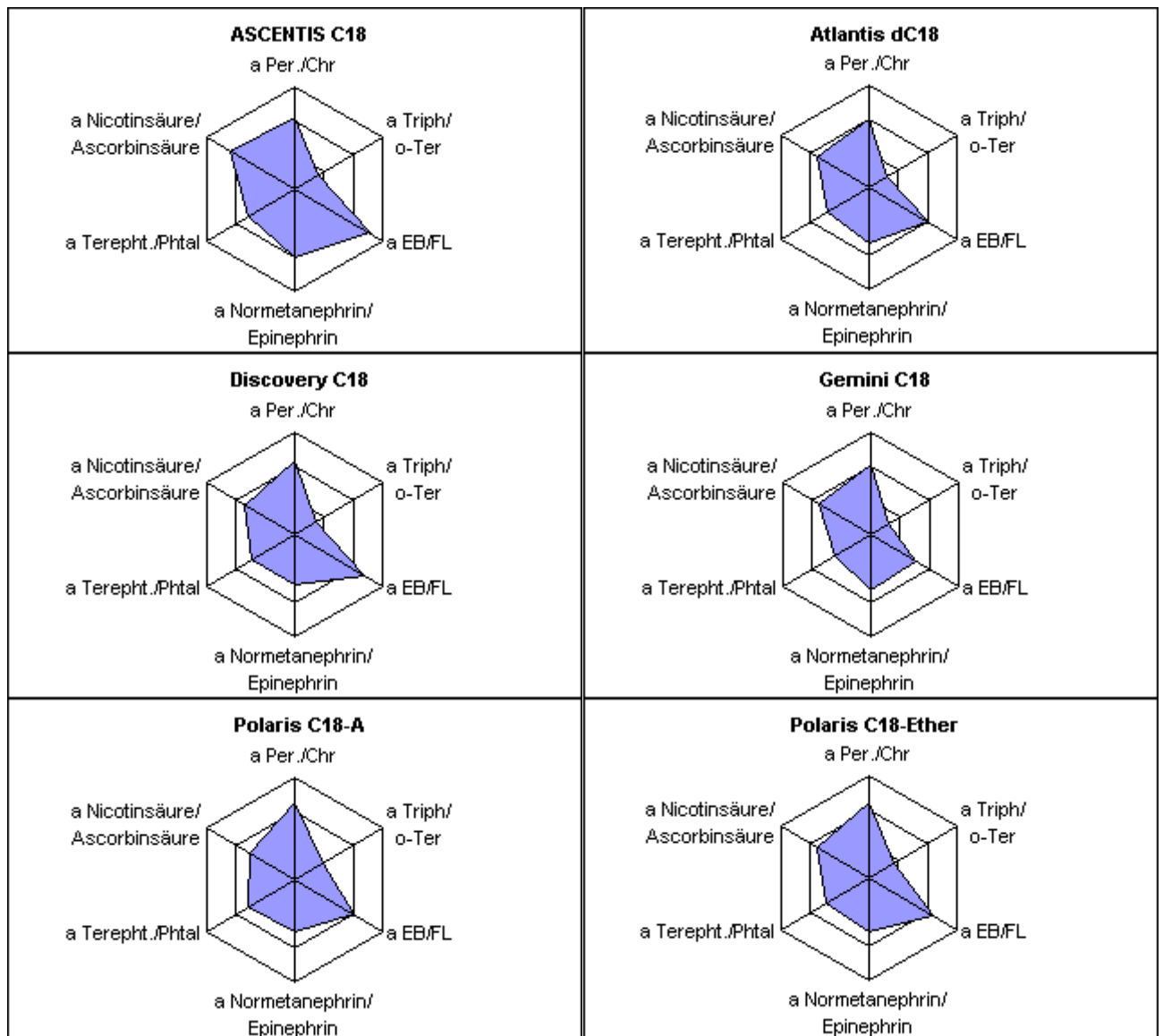


Abb. 4b:



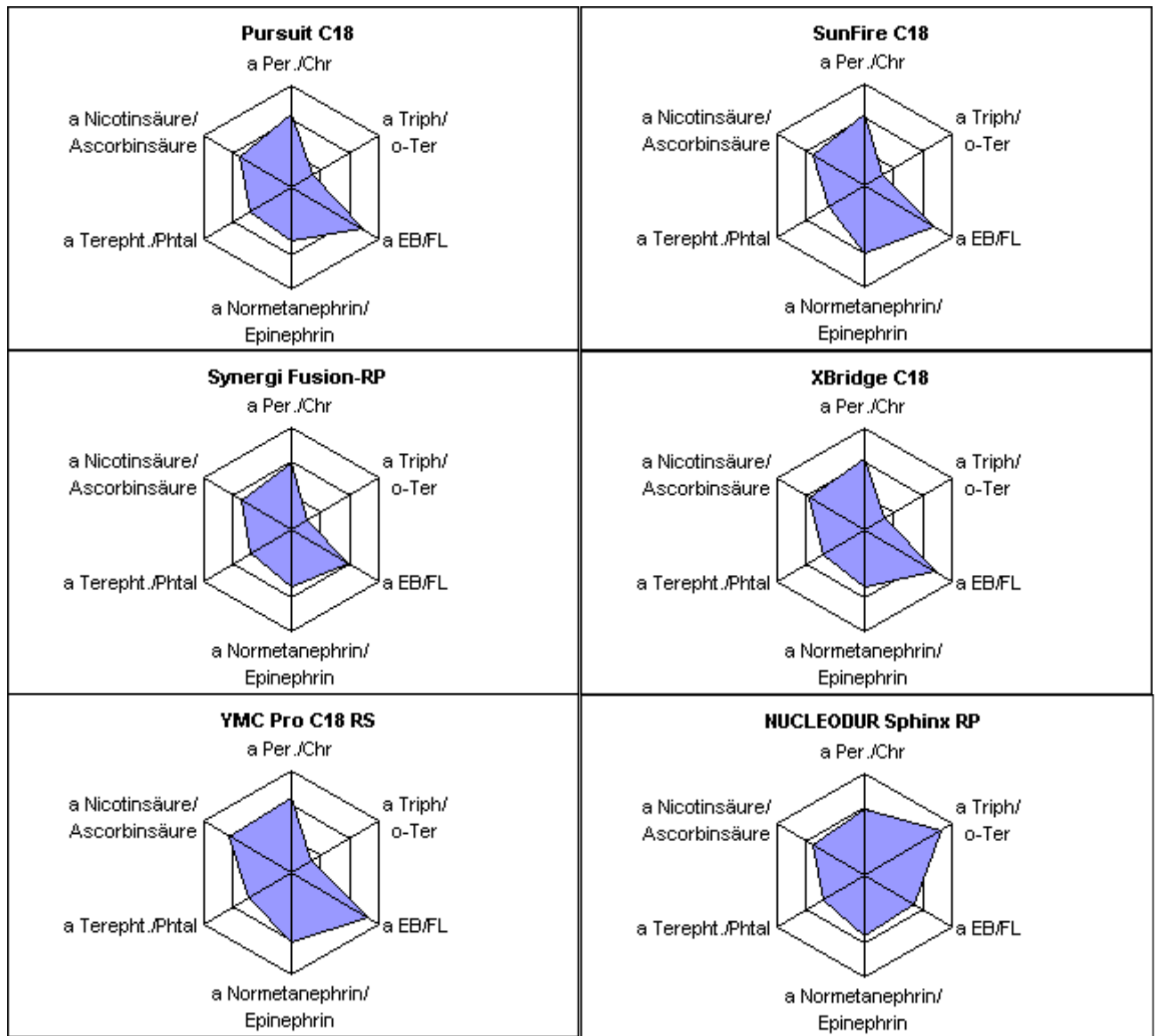
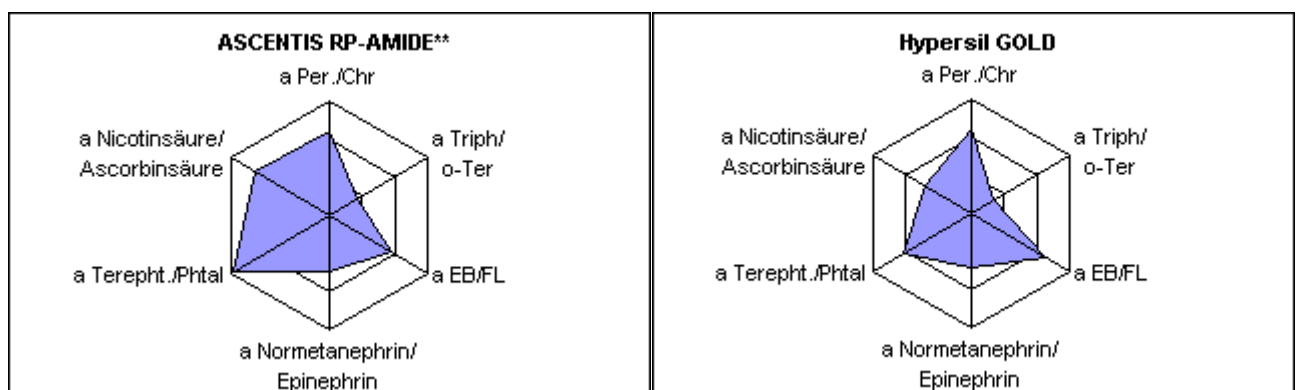
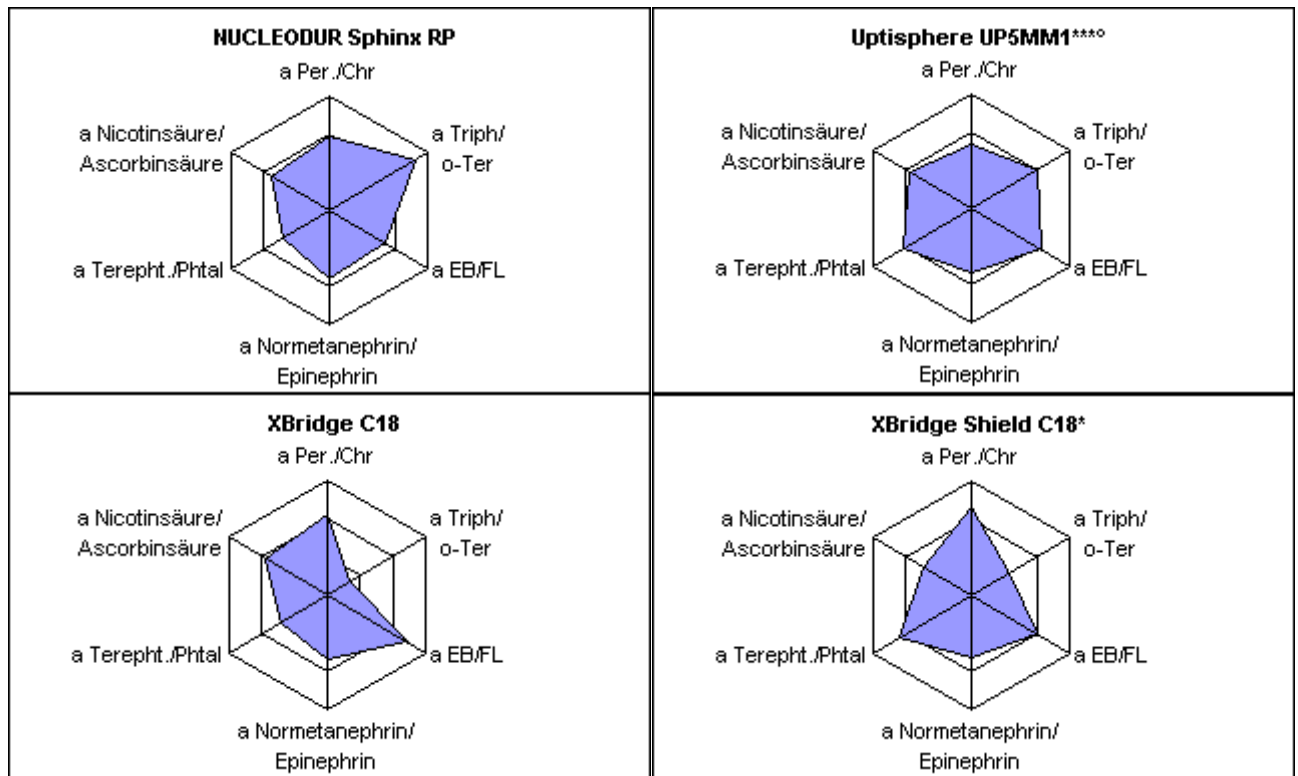


Abb. 5:





Zusammenfassung

Mit Hilfe der vorgestellten Tools „Selektivitätskarte“ und „Selektivitätshexagone“ ist es möglich, sich recht schnell ein Bild von der Ähnlichkeit von RP-Materialien zu machen. Das visuelle Erfassen von vielen Informationen in verdichteter Form durch die Darstellung in Form von Pictogrammen ermöglicht darüber hinaus das schnelle Finden von Alternativsäulen. Ferner können leicht Säulen unterschiedlicher Selektivität ausgesucht werden, die bei der Methodenentwicklung oder zur Überprüfung der Peakhomogenität mit Hilfe von orthogonalen Tests in Frage kommen könnten.

1. S. Kromidas (Hrsg) „HPLC richtig optimiert“, 2007, Wiley-VCH
2. Software „RP-Explorer 2007“, www.rp-explorer.de

- (1) z. Zt. Waters Chromatography, Milford, USA
- (2) Psychiatrische Klinik der Universität München, München
- (3) Saarbrücken